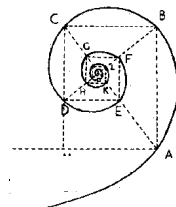




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



SCUOLA DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

CICLO XXVII

Anno Accademico 2013/2014

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

MED26

**GENERAZIONE DI IPSC COME MODELLO *IN VITRO* E
SVILUPPO DI UN POSSIBILE APPROCCIO TERAPEUTICO
PER LA MALATTIA DI CHARCOT-MARIE-TOOTH DI TIPO 2A (CMT2A)**

Dottorando: Federica RIZZO

Matricola N°R09587

TUTORE: Prof. Giacomo COMI

CO-TUTORE: Dott.ssa Stefania CORTI

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Ch.mo Prof. Mario CLERICI

SOMMARIO

La malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2A (CMT2A) è una polineuropatia sensitivo-motoria, caratterizzata da un coinvolgimento dei motoneuroni e dei neuroni sensitivi, che risulta in una progressiva ipostenia agli arti, atrofia muscolare e perdita della sensibilità. Mutazioni nel gene Mitofusina2 (MFN2) sono state identificate come causative della patologia. La proteina MFN2, localizzata a livello della membrana mitocondriale esterna, svolge funzioni essenziali nel network mitocondriale, la cui alterazione sembra essere alla base dei meccanismi patogenetici di diverse malattie neurodegenerative. Ad oggi, non esistono terapie risolutive per la CMT2A. Lo sviluppo di un'efficace terapia richiede una più approfondita conoscenza dei meccanismi molecolari della patologia, utili da un lato per identificare nuovi target terapeutici, ma anche per definire biomarcatori del fenotipo patologico.

Il primo obiettivo di questo studio è stata la generazione di un modello in vitro di malattia, attualmente non disponibile. La riprogrammazione di cellule somatiche mature in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) offre la possibilità di ottenere cellule paziente specifiche, come motoneuroni e neuroni sensitivi umani, tipicamente affetti nella patologia. Sfruttando questa metodica, abbiamo generato iPSC da un paziente CMT2A e abbiamo dimostrato il differenziamento in motoneuroni paziente specifici. Abbiamo studiato alcuni aspetti del network mitocondriale associati alla patologia, come la localizzazione mitocondriale, la quantità e la stabilità del DNA mitocondriale e l'attività dei complessi della catena respiratoria, nei motoneuroni CMT2A oltre che nei fibroblasti. In particolare, abbiamo osservato un'alterazione della localizzazione dei mitocondri, una riduzione della quantità di DNA mitocondriale e dell'attività dei complessi della catena respiratoria, identificando dei marcatori specifici del fenotipo patologico. Questi difetti sono risultati più marcati nelle cellule neuronali rispetto ai fibroblasti, in accordo con la specificità neuronale della patologia. Accanto ai modelli in vitro, l'analisi degli stessi aspetti è stata condotta nell'unico modello murino attualmente disponibile di CMT2A (MitoCharc 1), per ampliarne la caratterizzazione alla ricerca di biomarcatori del fenotipo patologico.

Come secondo obiettivo, ci siamo focalizzati sullo sviluppo di un approccio terapeutico per questa patologia. A questo proposito, abbiamo silenziato il gene MFN2 endogeno mediante short harpin RNA (shRNA) nei fibroblasti CMT2A. In parallelo, nelle stesse cellule, per ripristinare i normali livelli di espressione del gene MFN2, abbiamo introdotto il c-DNA del gene MFN2 modificato in modo da resistere al processo di silenziamento. I risultati ottenuti con questa strategia nei fibroblasti CMT2A sono stati molto promettenti e ci hanno permesso di ottenere alcuni dati preliminari anche nel modello murino.

In conclusione, questo studio ha contribuito ad approfondire i meccanismi molecolari patogenetici attraverso la generazione di un modello in vitro di CMT2A con iPSC paziente specifico e di identificare una possibile strategia terapeutica per la CMT2A.

ABSTRACT

Charcot-Marie-Tooth disease type 2A (CMT2A) is a sensory-motor polyneuropathy, characterized by the involvement of motor and sensitive neurons, resulting in progressive weakness, limb muscle atrophy and loss of sensitivity. Mitofusin2 (MFN2) gene has been identified as causative of the disease. The MFN2 protein, located in the outer mitochondrial membrane, is involved in the mitochondrial network. Defects in this network are features of several neurodegenerative diseases. A treatment for CMT2A is not currently available. The development of an effective therapy needs a better understanding of the molecular mechanisms of the disease, not only to identify new therapeutic targets, but also to define biomarkers of the disease phenotype.

The first aim of this study was the generation of an *in vitro* disease model, not currently available. The reprogramming of mature somatic cells into induced pluripotent stem cells (iPSCs) provides the derivation of disease-specific cell types, such as motor and sensitive neurons, affected in the disease. Based on this method, we successfully generated human iPSCs from a CMT2A patient and demonstrated their differentiation into motor neurons. We analyzed mitochondrial phenotypes (i.e mitochondrial localization, content and stability of mitochondrial DNA, and respiratory capacity) associated with the disease in CMT2A motor neurons as well as in fibroblasts. In particular, we observed an alteration in mitochondria localization, a reduction in the amount of mitochondrial DNA and a dysfunction of the mitochondrial respiratory chain, identifying specific hallmarks of the disease phenotype. These defects are more evident in neuronal cells compared to fibroblasts, in agreement with neuronal specificity of the disease.

In addition *in vitro* models, the analysis of these aspects has been conducted in the only currently available murine model of CMT2A (MitoCharc 1) to extend its characterization, searching for biomarkers of disease phenotype.

The second aim of this work was the development of a therapeutic approach for this disorder. We silenced endogenous MFN2 gene by short harpin RNA (shRNA) in CMT2A fibroblasts. At the same time, in order to restore correct MFN2 protein levels, we transfected a MFN2 c-DNA modified to be resistant to shRNA-mediated silencing. The results of this strategy were very promising in CMT2A fibroblasts, and preliminary data were also obtained in the CMT2A mouse model.

In conclusion, this study contributed to deepen the knowledge about disease molecular mechanisms, generating an *in vitro* model of CMT2A by patient-specific iPSCs, and to identify a possible therapeutic strategy for CMT2A.

INDICE

SOMMARIO.....	I
ABSTRACT	II
INDICE	III
INDICE DELLE FIGURE.....	VII
INDICE DELLE TABELLE.....	IX
ABBREVIAZIONI.....	X
1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 <i>Malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2A</i>	1
1.2 <i>Mitofusina 2: struttura e funzioni</i>	3
1.2.1 Il gene e la proteina Mitofusina 2.....	4
1.2.2 Ruolo della proteina MFN2 nel network mitocondriale	7
1.3 <i>Modelli murini di CMT2A</i>	14
1.4 <i>Approcci terapeutici</i>	16
1.4.1 Terapia farmacologica.....	16
1.4.2 Terapia cellulare	18
1.4.2.1 <i>Cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC)</i>	18
1.4.3 Terapia genica: RNA interfering	22
1.4.3.1 <i>I vettori adeno-virus associati come veicolo per la terapia genica</i>	25
2. SCOPO DEL LAVORO.....	30
3. MATERIALI E METODI	31

3.1. Ottenimento di fibroblasti da pazienti CMT2A	31
3.2 Produzione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) e differenziamento in motoneuroni (MN).....	32
3.2.1 Generazione di iPSC con metodo virale	32
3.2.2 Differenziamento di iPSC in MN.....	33
3.3 Modello murino di CMT2A.....	34
3.3.1 Protocollo per il genotipaggio	34
3.3.2 Analisi della funzionalità motoria e della sopravvivenza.....	35
3.4 Costruzione e validazione dei vettori per la terapia genica	35
3.4.1. Costruzione dei vettori per l'espressione di "shRNA"	35
3.4.2 Costruzione dei vettori per l'espressione di MFN2R.....	37
3.4.3 Protocollo di trasfezione dei vettori <i>in vitro</i>	38
3.4.4 Generazione dei vettori AAV9.....	39
3.4.5 Protocollo di somministrazione dei vettori AAV9	40
3.5 Analisi immunocitochimica.....	40
3.6 Analisi del potenziale di membrana.....	41
3.7 Real time RT-PCR	42
3.8 Long range PCR.....	43
3.8 Indagini biochimiche	44
3.9 Western blot.....	45
3.10 Analisi di microscopia elettronica del nervo sciatico	46
3.10.1 Preparazione dei campioni	46

3.10.2 Analisi morfologica e morfometrica	47
3.10.3 Analisi del numero dei mitocondri	48
3.11 <i>Analisi dei tessuti mediante immunoistochimica</i>	48
4. RISULTATI	50
4.1 <i>Ottenimento di fibroblasti da pazienti CMT2A</i>	50
4.2 <i>Produzione virale e caratterizzazione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC)</i>	51
4.3 <i>Generazione di motoneuroni da iPSC CMT2A e WT e loro caratterizzazione</i>	52
4.4 <i>Analisi del network mitocondriale nei fibroblasti e nei MN CMT2A</i>	54
4.4.1 <i>Analisi della localizzazione e della quantità dei mitocondri</i> .	55
4.4.2 <i>Analisi del potenziale di membrana</i>	57
4.4.3 <i>Analisi del DNA mitocondriale (mtDNA)</i>	58
4.4.4 <i>Studi biochimici dei complessi della catena respiratoria</i>	60
4.5 <i>Analisi del fenotipo mitocondriale nel modello murino di CMT2A</i>	61
4.6 <i>Terapia genica per la CMT2A</i>	68
4.6.1 <i>Generazione dei vettori anti-MFN2 shRNA and MFN2R</i>	68
4.6.2 <i>Validazione della terapia genica in vitro</i>	70
4.6.3 <i>Produzione e purificazione dei vettori AAV9-shRNA_{tg2} e AAV9-MFN2R_{tg2}</i>	72
4.6.4 <i>Validazione della terapia genica in vivo</i>	73
5. DISCUSSIONE	78
6. CONCLUSIONI.....	87

BIBLIOGRAFIA.....	89
PRODOTTI SCIENTIFICI.....	128
RINGRAZIAMENTI.....	130

INDICE DELLE FIGURE

<i>Figura 1.</i> Rappresentazione del gene <i>MFN2</i>	4
<i>Figura 2.</i> Struttura della proteina <i>MFN2</i>	5
<i>Figura 3.</i> Rappresentazione delle mutazioni a livello della proteina <i>MFN2</i> . .	6
<i>Figura 4.</i> Fusione e fissione mitocondriale.	9
<i>Figura 5.</i> Trafficking mitocondriale.	12
<i>Figura 6.</i> Silenziamento allele specifico mediante RNAi.....	24
<i>Figura 7.</i> Nuova strategia di RNAi.....	25
<i>Figura 8.</i> Mappa del vettore pSuper.puro.....	36
<i>Figura 9.</i> Mappa del vettore pCMV6-Entry.	38
<i>Figura 10.</i> Vettori scAAV9-shRNA _{tg2} e ssAAV9-MFN2R _{tg2}	39
<i>Figura 11.</i> Rappresentazione schematica della proteina <i>MFN2</i>	50
<i>Figura 12.</i> Generazione di una linea di iPSC CMT2A con metodo virale non integrante.....	52
<i>Figura 13.</i> Differenziamento di iPSC-WT e CMT2A in MN.	54
<i>Figura 14.</i> Localizzazione dei mitocondri in cellule WT e CMT2A.	56
<i>Figura 15.</i> Espressione della PORINA nelle cellule WT e CMT2A.	57
<i>Figura 16.</i> Analisi del potenziale di membrana mitocondriale nelle cellule WT e CMT2A.	58
<i>Figura 17.</i> Quantificazione del mtDNA nelle cellule WT e CMT2A.	59
<i>Figura 18.</i> Analisi dell'integrità del mtDNA nelle cellule WT e CMT2A.....	60
<i>Figura 19.</i> Analisi istochimica del muscolo vasto nei topi MitoCharc1 e nei controlli.	63
<i>Figura 20.</i> Analisi del numero di mitocondri nella porzione distale del nervo sciatico di topi MitoCharc1 e controlli.	64
<i>Figura 21.</i> Analisi morfologiche a livello del nervo sciatico di topi MitoCharc1 e controlli.	65
<i>Figura 22.</i> Quantificazione del mtDNA nei tessuti del modello murino MitoCharc1 e nei controlli.....	66

<i>Figura 23.</i> Espressione della proteina PORINA nel nervo sciatico dei topi MitoCharc1 e dei controlli.....	67
<i>Figura 24.</i> Sintesi del costrutto MFN2R.....	69
<i>Figura 25.</i> Espressione della MFN2 in cellule HeLa trasfettate con i costrutti shRNA/MFN2R.	70
<i>Figura 26.</i> Espressione della MFN2 in fibroblasti CMT2A trasfettati con i costrutti shRNA/MFN2R.....	71
<i>Figura 27.</i> Efficienza di trasduzione del vettore AAV9-GFP nel midollo spinale del modello murino di CMT2A.....	74
<i>Figura 28.</i> Espressione della proteina MFN2 nel muscolo gastrocnemio dopo trattamento con i vettori AAV9.....	75
<i>Figura 29.</i> Espressione della proteina MFN2 nel fegato di topi MitoCharc1 dopo somministrazione sistemica con i vettori AAV9.	76
<i>Figura 30.</i> Espressione della proteina MFN2 nel cervello di topi MitoCharc1 dopo somministrazione intracerebroventricolare con i vettori AAV9.	77

INDICE DELLE TABELLE

<i>Tabella 1.</i> Fenotipi clinici associati a mutazione nel gene <i>MFN2</i>	2
<i>Tabella 2.</i> Test genetici per la diagnosi di CMT2A.	3
<i>Tabella 3.</i> Protocollo di amplificazione del mtDNA.	43
<i>Tabella 4.</i> Analisi biochimica dell'attività dei complessi della catena respiratoria nelle cellule CMT2A rispetto alle cellule WT.....	61
<i>Tabella 5.</i> Analisi biochimica dell'attività della citrato sintetasi a livello del nervo sciatico di topi Mitochondarc1 e controlli.	67

ABBREVIAZIONI

ASO: oligonucleotidi antisenso

AAV: vettori adeno-virus associati

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

CMT2A: malattia di charcot-marie-tooth di tipo 2A

CS: Citrato Sintetasi

CoQ10: coenzima Q10

COX: citocromo c ossidasi

DRP1: dynamin related protein 1

ESC: cellule staminali embrionali

iPSC: cellule staminali pluripotenti indotte

iPSC-CMT2A: iPSC derivate da fibroblasti CMT2A

iPSC-WT: iPSC derivate da fibroblasti controllo

GDNF: glial-derived neurotrophic factor

GDPA1: ganglioside-induced differentiation-associated protein 1

GFP: green fluorescent protein

HMSN: Neuropatie Ereditarie Motorie e Sensitive

IGF1: insulin-like growth factor-1

Klf4: krueppel-like factor 4

LIF: leukemia inhibitory factor

MitoCharc1: modello murino CMT2A

MFN1: mitofusina1

MFN2: mitofusina2

MFN2Rtg1: c-DNA MFN2 resistente al silenziamento da shRNA^{tg}1

MFN2Rtg2: c-DNA MFN2 resistente al silenziamento da shRNA^{tg}2

MN: motoneuroni

MN-CMT2A: motoneuroni derivati da iPSC-CMT2A

MN-WT: motoneuroni derivati da iPSC-WT

mtDNA: DNA mitocondriale

NADH DH: NADH deidrogenasi
NANOG: homebox protein nanog
NT-3: neurotrofina3
OCT4: octamer-binding transcription factor 4
OPA1: optic atrophy 1 protein
PINK1: PTNE-induced putative kinase protein-1
RA: acido retinoico
RE: reticolo endoplasmico
RISC: complesso di silenziamento indotto da RNA
RNAi: RNA interfering
SCR: scramble
siRNA: small interfering RNA
Shh: sonic hedgehog
shRNA: short hairpin RNA
SMA: atrofia spinale muscolare
SLA: sclerosi laterale amiotrofica
SMN: survival motor neuron
SOD1: superossido dismutasi 1
SOX2: sex determining region Y-box 2
Succ DH: succinato deidrogenasi

1. INTRODUZIONE

1.1 Malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2A

La malattia di Charcot-Marie-Tooth (CMT) rappresenta un gruppo clinicamente e geneticamente eterogeneo di neuropatie ereditarie, anche definite come neuropatie ereditarie motorie e sensitive (HMSN), caratterizzato da un coinvolgimento dei motoneuroni (MN) e dei neuroni sensitivi, che risulta in una progressiva ipostenia agli arti, atrofia muscolare e perdita della sensibilità [1,2]. Con una prevalenza di 37/100.000 individui, viene considerata una delle più comuni patologie neurologiche a componente genetica [1-3]. Ad oggi, non esiste una terapia risolutiva per questi pazienti, la cui disabilità ha un elevato impatto sulla loro qualità di vita. Sulla base di criteri elettrofisiologici, si distinguono due sottotipi di CMT: le neuropatie demielinizzanti con velocità di conduzione nervosa inferiore ai 38 m/s (CMT1, 3 e 4) e le neuropatie assonali, con una velocità di conduzione superiore ai 38 m/s [2]. Sulla base dell'ereditarietà genetica, si possono distinguere tre forme assonali di CMT: dominante (CMT2), recessiva (CMT4) e recessiva legata ad X (CMTX).

Tra le CMT di tipo 2, la malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2A (CMT2A) è la forma assonale dominante più frequente, rappresentando il 20% delle CMT2 [4] e il 20-40% di tutte le CMT [5]. Recentemente, sono però state identificate forme recessive o semi-dominanti, suggerendo dei pattern di ereditarietà multipli [6]. Mutazioni nel gene Mitofusina 2 (*MFN2*) sono responsabili dell'insorgenza della CMT2A e di circa il 20% delle CMT [7,8].

I sintomi clinici tipici della CMT2A (forma classica) sono rappresentati da una progressiva debolezza e atrofia dei muscoli distali degli arti, deformità a livello dei piedi e perdita della sensibilità distale. Le difficoltà motorie possono essere in alcuni casi molto gravi da richiedere l'utilizzo di ausili per la deambulazione [1,2]. Accanto ad una forma più classica, spesso nei pazienti si osserva la comparsa di sintomi addizionali (forma plus), come la

perdita del riflesso tendineo e più raramente un coinvolgimento dei nervi cranici, scoliosi, paresi delle corde vocali, alterazioni dell'udito e glaucoma. Le alterazioni del sistema nervoso centrale (SNC) e la presenza di difficoltà respiratorie sono molto rare [9]. Ulteriori sintomi sono associati ad altre forme di CMT: HMSN di tipo V con paresi spastica e HMSN di tipo VI con atrofia ottica [10]. I segni clinici tipici della CMT2A con segni piramidali (HMSN V) sono associati a mutazioni nel gene *MFN2* con ereditarietà autosomica dominante [11]. In questi pazienti, la sintomatologia compare solitamente nella seconda decade, con una progressione più lenta [10]. La CMT2A con atrofia ottica (HMSN VI) è caratterizzata da un'ereditarietà sia autosomica dominante sia recessiva, e la gravità dei sintomi clinici è molto variabile anche in relazione all'età di esordio [12,13]. In questi pazienti si osserva neuropatia periferica e atrofia ottica bilaterale [12,13]. I principali fenotipi clinici di CMT2A sono riassunti nella seguente tabella (Tab 1).

PATOLOGIA	SEGN CLINICI
CMT2A: forma classica	Atrofia muscolare Deformità dei piedi Difficoltà a deambulare Perdita della sensibilità
CMT2A: forma plus	Neuropatia motoria e sensitiva Alterazioni della sostanza bianca Perdita dell'udito Paresi delle corde vocali
HMSN V	Neuropatia periferica Segni piramidali
HMSN VI	Neuropatia periferica Atrofia ottica

Tabella 1. Fenotipi clinici associati a mutazione nel gene *MFN2*.

Dal punto di vista clinico, non ci sono specifici tratti che permettono una completa distinzione della CMT2A dagli altri tipi di CMT2, tranne per alcuni

aspetti come la compromissione più grave e più precoce degli arti inferiori, un deficit motorio più marcato rispetto a quello sensitivo e spesso la comparsa di deformità a livello dei piedi (pes cavus) [14]. Analisi elettrofisiologiche possono orientare la diagnosi di neuropatia assonale, escludendo le forme demielinizzanti. Proprio per queste ragioni, la diagnosi di CMT2A richiede l'analisi del quadro clinico, ma sicuramente anche analisi genetiche volte a identificare alterazioni nel gene *MFN2* [14]. Poiché il gene *MFN2* è il solo gene noto le cui mutazioni sono causa di CMT2A, in casi sospetti per confermare la diagnosi, l'identificazione di mutazioni in questo gene è indispensabile [14]. Il riassunto dei test genetici per la diagnosi di CMT2A sono riportati nella seguente tabella (Tab 2).

Tabella 2. Test genetici per la diagnosi di CMT2A.

GENE	TEST GENETICI	MUTAZIONI IDENTIFICATE
<i>MFN2</i>	Analisi di sequenze/mutation scanning Analisi di specifici esoni Analisi di delezioni/duplicazioni	Varianti di sequenze Varianti di sequenze in esoni selezionati Delezioni/duplicazioni

1.2 Mitofusina 2: struttura e funzioni

Nel 2004, Züchner e colleghi hanno identificato per primi il gene Mitofusina 2 (*MFN2*), responsabile della CMT2A [7]. Questo gene codifica per la proteina Mitofusina 2 (*MFN2*), localizzata a livello della membrana mitocondriale esterna, e direttamente coinvolta, insieme ad altre proteine mitocondriali, nei processi di fusione, fissione e trafficking dei mitocondri, essenziali per la loro corretta funzionalità [15,16]. Alterazioni di queste dinamiche a diversi livelli sono responsabili di numerose patologie neurodegenerative come la CMT2A, ma anche la malattia di Alzheimer e di Parkinson [15,16].

1.2.1 Il gene e la proteina Mitofusina 2

Il gene umano *MFN2* è localizzato a livello del cromosoma 1p, in posizione 36.22, dalla base 11,980,180 alla base 12,013,514 [7] (Fig 1). La sequenza codificata è composta da 19 esoni [17]. Sono state identificate due differenti varianti del trascritto che codificano per la stessa proteina: la variante 1 (NM_014874) lunga 4685 paia di basi e la variante 2 (NM_001127660) lunga 4540, che differisce dalla prima per la regione non tradotta al 5' UTR. Il gene presenta un'espressione ubiquitaria in tutti i tessuti umani; risulta particolarmente espresso nel cuore, nel muscolo scheletrico, nel tessuto adiposo e nel fegato [17].

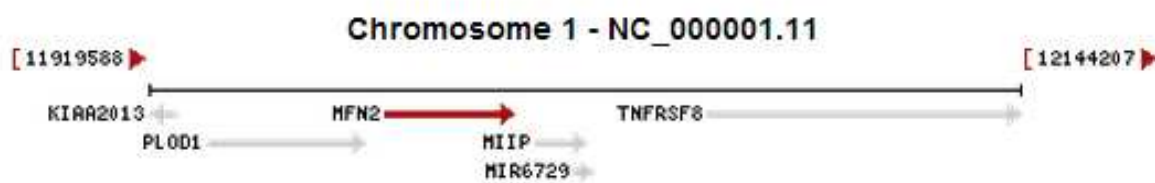


Figura 1. Rappresentazione del gene *MFN2*.

Il gene *MFN2* codifica per la proteina MFN2 con peso molecolare di 86KDa, (752 residui aminoacidici), localizzata a livello della membrana mitocondriale esterna. Presenta una struttura composta da un dominio GTPasico all'N-terminale, essenziale per l'idrolisi del GTP, da due domini idrofobici con heptad repeat (HR) localizzati uno al centro (HR1) e uno al C-terminale (HR2), responsabili delle interazioni coiled-coil, e da due domini transmembrana [18] (Fig 2). Entrambe le estremità N- e C-terminale sono localizzate nel citosol. Sono inoltre presenti domini ricchi in prolina, importanti per le interazioni con altre proteine. La struttura proteica, con i suoi domini è ampiamente conservata dal punto di vista evolutivo, soprattutto a livello del dominio GTPasico [18].

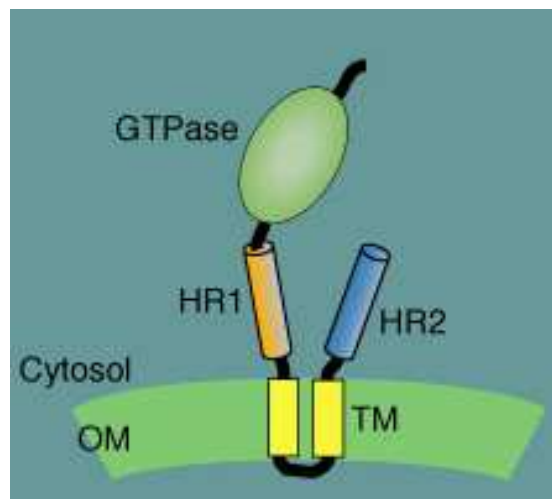


Figura 2. Struttura della proteina MFN2.

La MFN2 è localizzata a livello della membrana mitocondriale esterna (OM). Nella struttura, si possono osservare i due domini transmembrana (TM) e il dominio GTPasico. Le estremità N- e C-terminale sono entrambe localizzate a livello del citosol. HR1 e HR2 indicano due regioni ripetute ciascuno di 7 amminoacidi con una struttura coiled-coil.

Riprodotta da Chan research Group Caltech.

Ad oggi, nei pazienti CMT2A sono state identificate più di 100 mutazioni nel gene *MFN2*; molte sono mutazioni missenso nel dominio GTPasico (>50%) o nel dominio coiled-coil. Il dominio GTPasico contiene due hotspots in due regioni altamente conservate, una nel subdominio P-loop G1 (codone 94) e una nel subdominio G4. In alcuni casi, le mutazioni comportano un acquisto di funzione, mentre in altre si verifica una perdita delle funzioni della proteina stessa [19-21]. Un riassunto delle mutazioni identificate è rappresentato nella seguente figura (Fig 3).

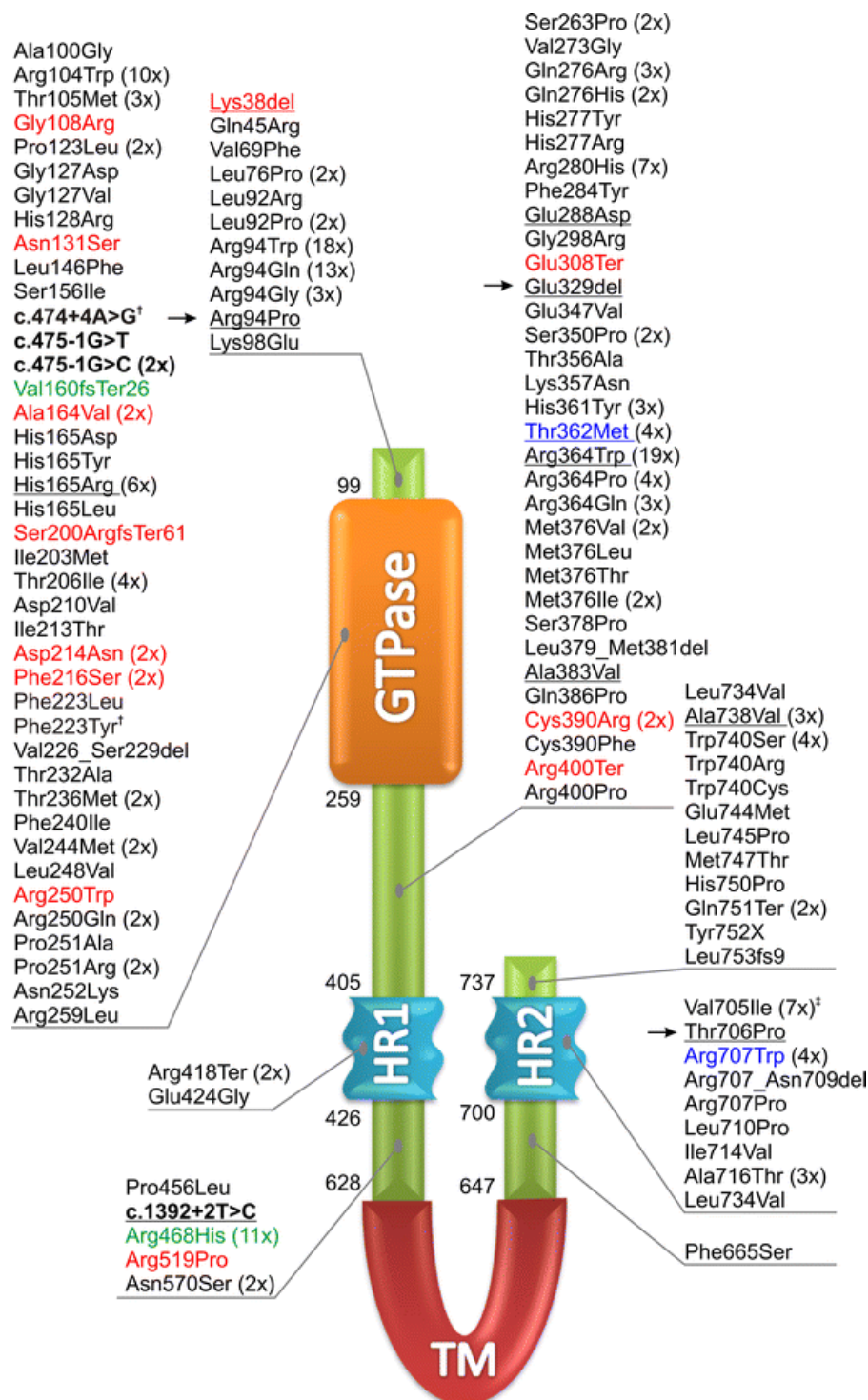


Figura 3. Rappresentazione delle mutazioni a livello della proteina MFN2.

Le mutazioni identificate nei pazienti CMT2A sono indicate con la loro frequenza. In rosso sono rappresentate le mutazioni recessive, in blu quelle descritte come recessive o dominanti. In grassetto sono indicate le mutazioni introniche.

Riprodotta da Bergamin G. *et al.*, 2014.

1.2.2 Ruolo della proteina MFN2 nel network mitocondriale

I mitocondri sono organelli intracellulari caratterizzati dalla presenza di due membrane, una esterna e una interna, che danno origine a due compartimenti acquosi: lo spazio intermembrana (delimitato da due membrane mitocondriali) e la matrice (circondata dalla membrana mitocondriale interna). Sono contraddistinti da una notevole dinamicità: svolgono un ruolo fondamentale nella vita delle cellule eucariote, fornendo quell'energia necessaria per i vari processi metabolici [15,22]. Sono presenti in tutti i tipi cellulari, ad eccezione degli eritrociti. I neuroni ne sono particolarmente ricchi soprattutto per l'elevato fabbisogno energetico a livello pre e post sinaptico [22], oltre che a livello dei nodi di Ranvier [23]. A livello cellulare, i mitocondri sono coinvolti in un complesso insieme di meccanismi altamente conservati, definiti nel loro insieme network mitocondriale, tra cui la fusione mitocondriale, il trasporto a breve e lunga distanza (trafficking mitocondriale) e il controllo qualità (mitofagia). Questi processi, essenziali per la funzionalità dei mitocondri e quindi indirettamente delle cellule stesse, sono regolati da diverse proteine, tra cui la MFN2 [24]. Visto quindi il ruolo della MFN2 nel network mitocondriale, non sorprende che alterazioni della sua funzione possano portare ad alterazioni dei pathway mitocondriali, come si verifica in alcune patologie tra cui la CMT2A [15,22,25-28]. Un numero sempre crescente di studi ha infatti dimostrato che alterazioni nei processi di fusione mitocondriale, nel controllo qualità e nel trafficking mitocondriale sono diretti responsabili di diverse patologie neurodegenerative, tra cui la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), la malattia di Parkinson e la malattia di Alzheimer, e non la conseguenza di un processo di degenerazione già in corso [22,28-34]. Malattie neurodegenerative, caratterizzate da mutazioni in proteine mitocondriali, sono quindi modelli interessanti per lo studio del coinvolgimento delle alterazioni mitocondriali nella neurodegenerazione.

Fusione mitocondriale: ruolo fisiologico e alterazioni

Uno dei primi ruoli attribuiti alla MFN2 è sicuramente il suo coinvolgimento nei processi di fusione mitocondriale, essenziali per garantire lo scambio di DNA e metaboliti, per il mantenimento della morfologia mitocondriale e del corretto numero di mitocondri [15,25,33]. Il processo di fusione per essere completo richiede sia la fusione delle membrane mitocondriali esterne sia di quelle interne. Per quanto riguarda la membrana esterna, tale processo è regolato, oltre che dalla MFN2, anche dalla Mitofusina1 (MFN1), un'altra proteina GTPasica, localizzata anch'essa a livello della membrana mitocondriale esterna [33,35]. MFN1 e MFN2 presentano un'elevata omologia (81%) e un'identità di circa il 60%. Queste due proteine formano dei complessi omo- ed etero-oligomerici in trans tra mitocondri vicini. L'idrolisi del GTP, mediata dal loro dominio GTPasico, e i conseguenti cambi conformazionali permettono la fusione fisica delle membrane mitocondriali esterne [33,35]. In assenza di entrambe le proteine, la fusione mitocondriale non si verifica, con la conseguente generazione di disfunzioni cellulari e mitocondriali [33,35]. Non è ancora del tutto chiaro quale sia la relazione funzionale tra MFN1 e MFN2 durante i processi di fusione mitocondriale. In esperimenti condotti in cellule prive di MFN1 o MFN2, ciascuna mitofusina sembra complementare l'assenza dell'altra, indicando la presenza di funzioni ridondanti [33,35,36]. Al contrario, alcuni studi suggeriscono distinti meccanismi per la MFN1 rispetto alla MFN2 [37,38]. Per quanto riguarda invece la membrana mitocondriale interna, la fusione richiede inizialmente l'idrolisi della cardiolipina, mediata dalla fosfolipasi D, e successivamente l'azione della proteina GTPasica Optic Atrophy 1 (OPA1) [39].

Il processo di fusione è in perfetto equilibrio con un altro processo del network mitocondriale, denominato fissione mitocondriale, necessario per il trasporto dei mitocondri e per l'eliminazione di quelli danneggiati [15]. Il

corretto equilibrio tra i processi di fusione e fissione mitocondriale permette il controllo del numero di mitocondri e della loro morfologia [40]. Il processo di fissione si verifica quando la proteina Dynamin related protein 1 (DRP1) viene recluta dal citosol a livello dei mitocondri [28]. Differenti proteine sono state proposte come possibili recettori di DRP1, tra cui le proteine adattatore (Fis1) e i fattori di fissione mitocondriale (Mff) [41,42]. La proteina DRP1 si assembla a formare spirali multimeriche attraverso una serie di interazioni tra differenti subunità e, mediante l'idrolisi di GTP, si ha la costrizione della spirale e la conseguente scissione mitocondriale [43,44]. Un altro regolatore del processo di fissione è la proteina ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 (GDPA1), localizzata sulla membrana mitocondriale esterna e appartenente alla famiglia delle S-transferasi, la cui attività di fissione è dipendente da DRP1 [40]. Una schematica rappresentazione del processo di fusione e di fissione mitocondriale è mostrato nella seguente figura (Fig 4).

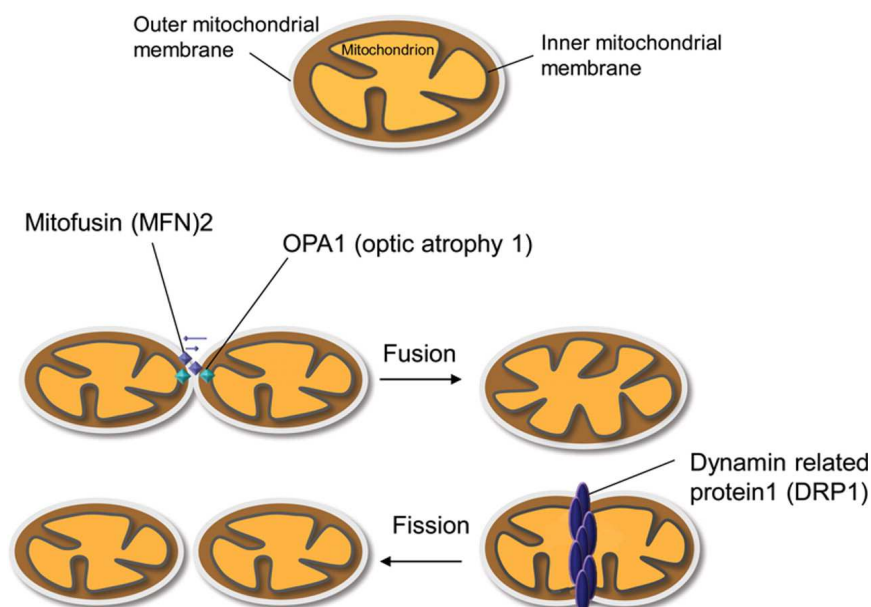


Figura 4. Fusione e fissione mitocondriale.

Rappresentazione schematica dei processi di fusione, mediati dalle proteine MFN2 e OPA1, e di fissione mitocondriale, dipendente dalla proteina Drp1.

Riprodotta da Milone M., Benarroch E.E., 2012.

Studi in cellule esprimenti alleli MFN2 con mutazioni associate a CMT2A hanno suggerito modelli per la specificità neuronale di questa patologia. L'overespressione di forme mutate di *MFN2* nelle cellule dei gangli dorsali di ratto ha mostrato l'accumulo di mitocondri nel corpo cellulare, la presenza di pochi mitocondri negli assoni distali e un incremento del numero di organelli stazionari [26]. Studi analoghi sono stati condotti in altri tipi cellulari come i fibroblasti embrionali murini (MEF) knockout per MFN1 e MFN2, esprimenti alleli MFN2 con mutazioni associate alla patologia [25]. Queste analisi hanno mostrato che la MFN1 può complementare i difetti di fusione di diversi mutanti MFN2. La presenza di livelli di MFN1 più bassi nei neuroni, rispetto ad altri tipi cellulari, potrebbe inoltre spiegare la specificità neuronale della patologia [25]. Successivamente sono stati condotti esperimenti in fibroblasti derivati da biopsie cutanee di pazienti CMT2A con diverse mutazioni nel gene MFN2, ottenendo dei dati apparentemente discordanti circa il ruolo delle mutazioni nel gene MFN2 [27,45,46]. In un primo studio, i fibroblasti hanno mostrato una normale distribuzione dei mitocondri, ma un difetto a livello energetico [45]. In un altro studio, nei fibroblasti con diverse mutazioni (T105M, I213T, V273G) nella proteina *MFN2*, non si sono osservate alterazioni della morfologia mitocondriale, del contenuto di DNA mitocondriale (mtDNA) o della capacità respiratoria, confermando la specificità neuronale della patologia [46]. In un lavoro più recente, i fibroblasti di quattro pazienti CMT2A hanno invece mostrato una disfunzione della capacità respiratoria che può essere spiegata da un decremento del contenuto di mtDNA di circa due volte. Sono state inoltre osservate delezioni del mtDNA, i cui breakpoints sembrano marcare nei punti essenziali per la replicazione. Questi dati sembrano sostenere l'ipotesi che le mutazioni della MFN2 alterano la fosforilazione ossidativa a livello mitocondriale, agendo sulla replicazione del mtDNA [27].

Trafficking mitocondriale

Con la terminologia di trafficking mitocondriale ci si riferisce ad un insieme di meccanismi che permettono il corretto posizionamento dei mitocondri, attraverso movimenti anterogradi o retrogradi a brevi o lunghe distanze, mediante formazione e rottura di legami con le proteine del citoscheletro [40,47]. La MFN2 sembra svolgere un ruolo importante anche in questi processi, interagendo con le proteine Miro e Milton. Nel trasporto anterogrado, Miro e Milton legano i mitocondri alle kinesine, proteine associate ai microtubuli [48,49]. Responsabili del trasporto retrogrado sono invece le interazioni con le dineine [40,47,50-53]. Oltre al corretto movimento dei mitocondri, altrettanto importante è l'opportuna localizzazione di questi organelli nello spazio intracellulare, mediata dalla sintafilina che lega la membrana mitocondriale esterna ai microtubuli, ancorandoli in quella specifica posizione [40,54,55]. L'opportuno numero di mitocondri in ogni spazio intracellulare è proprio garantito dall'equilibrio tra questi processi, la cui schematica rappresentazione è mostrata nella seguente figura (Fig 5).

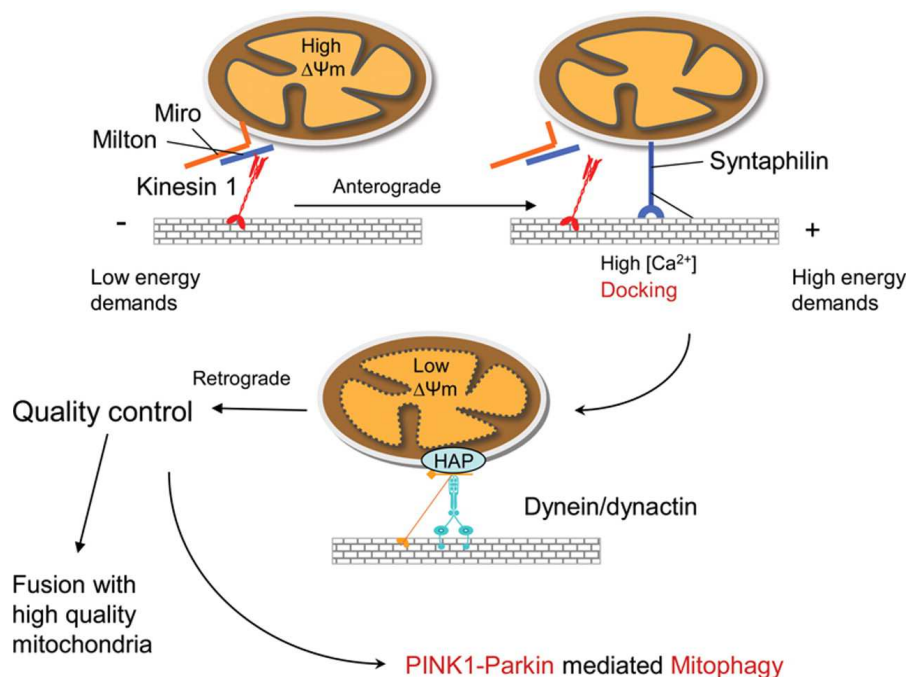


Figura 5. Trafficking mitocondriale.

Il trasporto mitocondriale dipende da un processo di formazione/rottura di legami con le proteine motorie del citoscheletro. La Kinesina1 interagendo con le proteine Miro e Milton è responsabile del trasporto anterograde dei mitocondri. Le proteine appartenenti alla famiglia delle Dineine sono invece responsabili del trasporto retrogrado dei mitocondri lungo gli assoni. La proteina HAP1 si associa con i mitocondri e interagisce con kinesine e Dineine per permettere il trasporto del cargo sui microtubuli. La proteina sintafilina lega la membrana mitocondriale esterna, ancorando i mitocondri ai microtubuli.

Riadattata da Milone M., Benarroch E.E., 2012.

Come per i processi di fusione mitocondriale, anche per lo studio del trafficking mitocondriale, esperimenti condotti in modelli cellulari esprimanti alleli MFN2 mutati sono stati estremamente utili. In MEF knockout per MFN2, in motoneuroni e in neuroni dei gangli dorsali di origine murina esprimanti forme mutate di MFN2 si è osservata una aggregazione di mitocondri a livello del corpo cellulare e una minore distribuzione a livello periferico, sostenendo l'ipotesi di un difetto di trasporto [25,26,33]. È interessante osservare come, in presenza di mutazioni nel gene *MFN2*, entrambi i tipi di trasporto risultino alterati. I movimenti, come mostrato dagli

esperimenti di time lapse, sono più lenti, con un numero maggiore di pause, probabilmente dovute all'incapacità dei mitocondri di interagire con il sistema di trasporto e quindi non solo di essere trasportati fino alla periferia, ma soprattutto di localizzarsi nella giusta sede [49]. Anche il trafficking mitocondriale può aiutare a spiegare la specificità neuronale che si riscontra in questa patologia. La degenerazione solo degli assoni motori e sensitivi più lunghi è giustificata dalla presenza di regioni distali dal corpo cellulare ad elevato metabolismo che sono più sensibili alla richiesta di mitocondri e quindi un'alterazione del trafficking mitocondriale ha sicuramente un effetto maggiore in questi tipi cellulari.

Mitofagia

Le cellule hanno un meccanismo di controllo qualità che distingue i mitocondri in buone condizioni da quelli danneggiati sulla base delle differenze del potenziale di membrana. Questo processo previene l'accumulo di mitocondri danneggiati attraverso un equilibrio dinamico tra fusione e fissione mitocondriale. I mitocondri danneggiati sono eliminati attraverso un processo di mitofagia. La mitofagia è dipendente da un sistema proteasoma-ubiquitina e coinvolge proteine come PARKINA e PINK1 (PTNE-induced putative Kinase protein-1) (Fig 5). PINK1 è una chinasi serina/treonina che ha un rapido turnover, regolato dalla proteina PARL, localizzata a livello della membrana mitocondriale interna e dipendente dalle variazioni del potenziale di membrana. La depolarizzazione mitocondriale blocca l'attività di PARL e causa un accumulo di PINK1 sulla membrana mitocondriale esterna. PINK1 fosforila PARKINA, la quale ubiquitilina MFN2, inducendone la degradazione mediante proteasoma. Questo meccanismo stimola anche il reclutamento di una serie di molecole coinvolte nei processi di autofagia, portando alla degradazione del mitocondrio [28,56-63]. Cellule prive di MFN2 presentano mitocondri anomali che devono essere degradati. Molto spesso però la

formazione di autofagosomi in assenza di MFN2 o in presenza di forme mutate di MFN2 è risulta alterata [28,64].

Funzioni extra mitocondriali

Accanto alle funzioni mitocondriali, la proteina MFN2 svolge anche altre importanti funzioni, come ad esempio la regolazione dei processi di interazione tra i mitocondri e il reticolo endoplasmico (RE). La MFN2 lega il RE ai mitocondri, regolando la morfologia del RE e l'up-take mitocondriale di Ca^{2+} , rilasciato dal RE [48]. Alterazioni della macchina della sintesi proteica o dell'omeostasi del Ca^{2+} generano una condizione definita stress del RE, caratterizzata dall'attivazione di una serie di meccanismi compensatori come la trascrizione di geni chaperone che incrementano la capacità di folding delle proteine e l'attivazione del sistema di degradazione delle proteine misfoldate [65]. Nel caso in cui questi accorgimenti non siano sufficienti, viene innescato un meccanismo di apoptosi che porta alla morte della cellula stessa.

1.3 Modelli murini di CMT2A

Nel corso degli anni, diversi modelli animali di CMT2A sono stati prodotti, ed è risultato evidente il grande contributo che essi hanno fornito nella comprensione delle caratteristiche e delle funzioni del gene *MFN2*, della patogenesi e dei meccanismi molecolari alla base della malattia e nel testare l'efficacia di nuove potenziali terapie. Diversi sono gli esperimenti di knockout o di espressione di forme mutate di *MFN2* condotti in *Drosophila* [66] e in Zebrafish (*Danio rerio*) [67] che hanno dimostrato il ruolo essenziale di questa proteina prima di tutto nel network mitocondriale e soprattutto il suo legame con alterazioni neuromuscolari e motorie tipiche dei pazienti CMT2A.

I modelli murini transgenici rappresentano molto probabilmente il modello più vicino all'uomo e quindi più utile alla ricerca biologica e medica.

Inizialmente sono stati generati modelli knockout per il gene *MFN2* per incrementare le conoscenze circa il suo ruolo nel network mitocondriale. Più recentemente sono stati generati modelli murini esprimenti specifiche mutazioni identificate nei pazienti in modo da arrivare ad avere dei modelli murini di CMT2A il più simile possibile alla condizione patologica in cui poter testare eventuali strategie.

I modelli murini knockout per i geni *MFN1* o *MFN2* risultano letali allo stato embrionale, dimostrando il ruolo delle mitofusine nei processi di sviluppo [33]. Per risolvere il problema della letalità embrionale, è stato generato un modello murino con delezioni condizionali della *MFN2* a livello delle cellule del Purkinje, dimostrando il ruolo di questa proteina nella sopravvivenza, crescita dei dendriti e funzionalità delle cellule sia nello sviluppo che nella fase più matura [68]. Un anno dopo, un altro gruppo ha valutato l'effetto dell'overespressione di una forma mutata di *MFN2* (*MFN2*T105M) solo a livello dei MN. In questi animali omozigoti per questa mutazione, è stata osservata una severa e generale perdita assonale dei MN [69]. In particolare, il modello murino *MFN2*-T105M riproduce i tratti clinici della patologia CMT2A in modo dose dipendente. Presenta un grave difetto di andatura a causa di un'incapacità a piegare le zampe posteriori. Questa debolezza muscolare distale è associata ad un ridotto numero di assoni nelle radici motorie e nei muscoli anteriori del polpaccio. Molti MN mostrano un'inappropriata distribuzione mitocondriale [69]. Più recentemente è stato generato un altro modello murino di CMT2A (*MitoCharc1*) in cui si ha l'espressione della forma umana mutata (R94Q) della proteina *MFN2* solo a livello del sistema nervoso in quanto l'espressione del transgene è regolata da un promotore enolasi specifico [70]. Il topo *MitoCharc1* riproduce i tipici sintomi della CMT2A, tra cui difficoltà motorie e una variazione della dimensione degli assoni mielinizzati, con diametro inferiore ai 3.5 μm , che correla con un incremento del numero dei mitocondri in

questi assoni intorno ai 5 mesi di età. Analisi biochimiche hanno inoltre rilevato un difetto combinato dei complessi II e V (riduzione del 40% e 30% rispettivamente) della catena respiratoria [71]. Come controllo è stato generata una linea transgenica (MitoCharc0) che esprime a livello del sistema nervoso il gene umano *MFN2* [70]. Come atteso, il topo non mostra nessun sintomo clinico riconducibile alla patologia, confermando che la sintomatologia riscontrata è effettivamente dovuta all'espressione della forma mutata del gene *MFN2*.

1.4 Approcci terapeutici

Ad oggi, non esistono ancora strategie terapeutiche totalmente efficaci per la cura delle CMT. Nel corso degli anni, con l'acquisizione d'informazioni più precise circa i meccanismi patogenetici e la storia naturale di questo gruppo di malattie, sono stati proposti diversi approcci per cercare di modificare il decorso di tale patologia.

I tre campi d'indagine terapeutica sono:

- terapia farmacologica
- terapia cellulare
- terapia genica

1.4.1 Terapia farmacologica

La terapia farmacologica, ad oggi, propone diverse tipologie di composti la cui potenziale efficacia per le CMT è attualmente in corso di verifica [72]. A questo proposito numerosi sono i trial clinici in corso basati sull'utilizzo di differenti composti farmacologici.

Acido Ascorbico

L'acido ascorbico è un composto essenziale per la sintesi della mielina a livello delle cellule di Schwann [73]. La somministrazione di questo composto per 1 mese in modello murino di CMT1A ha mostrato un arresto del declino motorio, un aumento della sopravvivenza e una parziale

correzione dei difetti legati alla mielinizzazione [74]. Recentemente, risultati altrettanto soddisfacenti sono stati ottenuti in 110 pazienti affetti da CMT1 dopo trattamento con dosaggio orale di acido ascorbico (4 g/die). Essi hanno mostrato una riduzione del 50% del valore soglia per la diagnosi di neuropatia CMT [75].

Coenzima Q10

Il Coenzima Q10 (CoQ10) è un accettore di elettroni della catena di trasporto con proprietà anti-ossidanti. La somministrazione di basse dosi di CoQ10 in soggetti CMT ha mostrato notevoli benefici [76]. Ad oggi, è attualmente in corso una sperimentazione clinica in 46 soggetti CMT trattati con CoQ10 (300 mg) 2 volte al giorno per 60 settimane.

Neurotrofina-3

Differenti studi hanno dimostrato la presenza di un deficit di Neurotrofina-3 (NT-3) nei pazienti CMT1A [77]. Pazienti CMT1A trattati con NT-3 (150 microg/kg) a livello sottocutaneo 3 volte alla settimana per 6 mesi hanno mostrato risultati incoraggianti con un significativo miglioramento della componente sensitiva ma non motoria e un incremento della densità di singole fibre mielinate rispetto ai pazienti trattati con il placebo [77].

Curcumina

La Curcumina ha effetti antiossidanti, antiproliferativi, anti-infiammatori e effetti modulatori sul folding/misfolding, come mostrato in diversi modelli *in vitro* e *in vivo* [78,79]. Nell'uomo risulta ben tollerata anche a dosi di 12 g/giorno [78,79]. Il meccanismo di azione di questo composto non è del tutto noto, ma potrebbe rappresentare una potenziale terapia per le forme di CMT che sono associate alla formazione di aggregati a livello del reticolo endoplasmico e al missfolding proteico [78,79].

Antagonista del progesterone

Il Progesterone è prodotto dalle cellule staminali e dai neuroni e influenza l'espressione di geni associati alla mielina (*PMP22* e *MPZ*) e dei loro fattori

trascrizionali [79,80]. Studi condotti in modelli murini di CMT1A hanno mostrato un miglioramento del fenotipo clinico e patologico e un incremento dell'mRNA del gene *PMP22* a livello del nervo sciatico di circa il 30%, in seguito al trattamento con questo composto [80].

1.4.2 Terapia cellulare

Il trapianto di cellule staminali può essere una potenziale strategia terapeutica per le neuropatie periferiche tra cui la CMT2A. Tra le diverse tipologie di cellule staminali, le cellule staminali neurali (NSC) potrebbero portare ad un miglioramento attraverso molteplici meccanismi tra i quali: 1) sostituzione neuronale associata al rilascio di fattori neuroprotettivi prodotti dalle cellule staminali [82]; 2) riduzione di sostanze tossiche nel microambiente [83]; 3) sostituzione di cellule non-neuronali [84]. E' stato dimostrato, sia dal nostro gruppo che da altri, che il trapianto di NSC può migliorare il fenotipo neuropatologico in modelli animali di malattie del motoneurone [84-91]. Un'altra popolazione di staminali potenzialmente interessanti, come strategia terapeutica per le CMT, è rappresentata dalle cellule staminali mesenchimali (MSC), capaci di transdifferenziare in cellule di Schwann e di produrre fattori antiapoptotici con attività neuroprotettiva [92].

Le cellule staminali embrionali umane (hES) o le recenti cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) possono rappresentare una potenziale sorgente cellulare per una strategia cellulo-mediata anche in patologie come le CMT. La combinazione del trapianto cellulare con il trattamento farmacologico o la terapia genica potrebbero aumentarne l'efficacia terapeutica.

1.4.2.1 Cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC)

Le cellule staminali sono cellule che hanno sia la capacità di autorinnovarsi che di generare molteplici tipi cellulari terminalmente differenziati. Per essere definita staminale, una cellula deve soddisfare due proprietà principali: l'autorinnovamento, cioè la capacità di compiere un numero

“illimitato” di cicli replicativi mantenendo il medesimo stato indifferenziato, e la capacità di dare origine a uno o più tipi cellulari differenziati [93].

Esistono diversi tipi di cellule staminali che possono essere suddivisi in *totipotent*, *pluripotent* e *multipotent* sulla base del potenziale differenziativo. Le cellule totipotent sono in grado di differenziarsi in qualsiasi tipo cellulare; devono essere prelevate nelle prime fasi di sviluppo dell'organismo, dallo zigote fino alla blastocisti. Le cellule pluripotent possono specializzarsi in tutti i tipi di cellule che troviamo in un individuo adulto, ma non in cellule che compongono i tessuti extra-embryonali. Devono essere prelevate dalla Inner Cell Mass della blastocisti [94,95]. Le cellule multipotent sono specifiche di ciascun tessuto, dando origine ad un numero limitato di tipi cellulari.

Grazie alla loro capacità differenziativa, le ESC da decenni sono oggetto dell'attenzione investigativa dei ricercatori. Le cellule ES proliferano indefinitamente *in vitro* mantenendo comunque la capacità di differenziarsi in tutti i tipi di cellule somatiche. Sono state isolate per la prima volta nel 1981 [94]. Possono essere mantenute in coltura con LIF (leukemia inhibitory factor) su un feeder layer di fibroblasti embrionali [95-98]. In assenza di LIF o rimuovendo il feeder layer, le cellule ES si differenziano spontaneamente in aggregati multicellulari, detti corpi embrionali [95].

Nell'ambito della ricerca sulle ESC sono stati sviluppati diversi protocolli di differenziamento *in vitro*, col fine di ottenere specifici sottotipi cellulari neuronali e gliali. L'esposizione all'acido retinoico (RA) e al Sonic hedgehog (Shh) indirizza le cellule ES verso un fenotipo motoneuronale [99], mentre altre molecole possono portare al differenziamento in neuroni dopaminergici [100,101], neuroni telencefalici [102], astrociti [103], oligodendrociti [104,105] e microglia [106]. Le ESC possono essere impiegate anche a scopo terapeutico per curare patologie neurodegenerative o in altri settori della medicina [95]. L'utilizzo di queste

cellule però è complicato a causa dei problemi di rigetto che esse possono indurre in quanto eterologhe, e a causa di problematiche etiche. Nell'ottica di superare questi ostacoli, un' importante scoperta degli ultimi anni è stata, quindi, quella delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) [107]. Queste cellule sono generate riprogrammando cellule somatiche adulte ad uno stato di pluripotenza, attraverso l'espressione di fattori di trascrizione. Le iPSC possiedono tutte le caratteristiche delle ESC: esprimono gli stessi marcatori di staminalità; mantengono le potenzialità di auto-rinnovamento, sono in grado di differenziare nei tre foglietti embrionali e di formare teratomi se trapiantate in organismi immunodeficienti.

Per ottenere le cellule iPS sono stati studiati i possibili fattori responsabili della staminalità e i metodi per poterli trasferire direttamente nelle cellule riceventi [107]. I principali fattori individuati in grado di indurre una riprogrammazione in senso pluripotente sono:

- Oct4 [108,109], il cui livello di espressione si è visto influenzare molto il destino delle cellule embrionali;
- Sox2 [110-112], la cui presenza è indispensabile per il mantenimento della pluripotenza nelle ESC [113-115];
- Nanog [116,117], la cui assenza determina il differenziamento delle cellule embrionali [114,118], e la sua espressione genica è regolata da Sox2 e Oct4 [119,120], con i quali condivide anche molti target genici [121,122];
- c-Myc [123], possiede numerosi target genici e sembra in grado di modificare la struttura della cromatina [124] e di attivare l'espressione di alcuni miRNA [125];
- Klf4 [126], uno dei suoi target è p21, la cui assenza determina una proliferazione cellulare per l'azione di Klf4 su p53, e coopera inoltre con Oct3/4 e Sox2 nell'attivazione di Lefty1 core promoter [127].

- Lin28 [107,128], blocca il processo di differenziamento mediato dai miRNA. Il suo locus è stato identificato come sito di legame per Oct3/4, Sox2 e Nanog [129].

Takahashi e Yamanaka sono stati i primi ad usare questi fattori per la riprogrammazione di fibroblasti cutanei. In particolare Sox2, Oct3/4, c-Myc e Klf4 sono stati trasfettati con un trasportatore retrovirale [130,131]. Dopo la trasfezione, queste cellule mostravano caratteristiche genetiche e morfologiche simili alle ESC ed erano inoltre in grado di formare teratomi, provando così la loro pluripotenza. Questa tecnica è stata approfondita nel tempo da studi successivi, volti soprattutto a definire quali fattori siano più efficienti nell'indurre la riprogrammazione [107,132-134]. Yu ha descritto la generazione di iPSC sempre tramite la trasfezione di fattori di riprogrammazione, ma senza la necessità di vettori virali, diminuendo quindi le modificazioni indotte alle cellule riceventi e rendendo queste cellule ancora più simili a cellule fisiologiche. Questo risultato è stato ottenuto tramite la nucleofezione di sei fattori di riprogrammazione (OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-Myc e KLF4) veicolati tramite vettori oriP/EBNA1, metodica applicata anche in altri lavori [135-137]. La pluripotenza delle iPSC le rende un'abbondante e importante fonte per la generazione di cellule specifiche direttamente coinvolte nella patologia, che non possono essere prelevate dai pazienti mediante biopsia, da utilizzare oltre che come fonte cellulare per le strategie terapeutiche cellulo-mediate, come modelli *in vitro* di malattia per lo studio dei meccanismi patogenetici e per lo screening di molecole farmacologiche [136,138-140]. Ad esempio nelle CMT, il danno si concentra quasi esclusivamente a livello dei MN e dei neuroni sensitivi, cellule difficilmente isolabili dal paziente tramite biopsia, ma estremamente importanti per potere studiare la patogenesi. Ad oggi, nessun modello di malattia basato sulle iPSC è ancora stato generato per le CMT, ma sulla base di risultati soddisfacenti in altre patologie

mitocondriali [141], la generazione di iPSC da fibroblasti cutanei di pazienti CMT2A e la conseguente generazione di MN e neuroni sensitivi potrebbero ricapitolare i difetti specifici della malattia.

1.4.3 Terapia genica: RNA interfering

Pur non esistendo ad oggi una terapia genica risolutiva per le CMT, le terapie basate sugli oligonucleotidi antisenso (ASO) o RNA interfering (RNAi) potrebbero essere molto promettenti per arrivare ad una effettiva cura [142].

Gli oligonucleotidi antisenso (ASO) sono piccole molecole di RNA a singolo filamento o di DNA capaci di legare un mRNA target con sequenza complementare, inibendone la traduzione o degradando il trascritto stesso [143,144]. Gli ASO possono anche essere utilizzati per modificare i pre-mRNA, favorendo processi di exon skipping oppure facilitando l'inclusione di specifici esoni [143]. Una variante degli ASO classici, sono gli oligonucleotidi morfolino, caratterizzati da modificazioni chimiche e strutturali. Essi presentano una bassa tossicità e sono ampiamente utilizzati in trial clinici per diverse patologie, tra cui la Distrofia Muscolare di Duchenne [145-147].

L'RNA interfering (RNAi) è un meccanismo naturale di silenziamento genico post-trascrizionale mediato da piccole molecole di RNA di natura endogena, come i microRNA, o esogena, come gli small interfering RNA (siRNA) o gli short hairpin RNA (shRNA) [148]. Queste piccole molecole di RNA a doppio filamento vengono incorporate nel complesso di silenziamento indotto da RNA (RISC). In questo modo, i due filamenti vengono separati e il filamento senso guida RISC alla regione complementare o adiacente alla regione complementare dell'RNA target, inducendo la degradazione del trascritto o bloccando il processo di traduzione [148]. Questo meccanismo è stato descritto per la prima volta in *Caenorhabditis elegans* nel 1998, successivamente nelle piante e nei

mammiferi [149]. Nel 2001, i siRNA esogeni sono stati utilizzati per la prima volta per il silenziamento gene specifico in cellule di mammifero [150]. Nel 2002, la stessa tecnica è stata applicata anche *in vivo* in modelli murini [151]. Visti i risultati soddisfacenti, l'RNAi è diventato uno degli strumenti più utilizzato per lo studio delle funzioni geniche e una potenziale strategia terapeutica per il trattamento di diverse malattie [152]

Questa strategia, come dimostrato dai diversi trial clinici attualmente in corso, può essere applicata a diverse patologie dalle malattie immunitarie [153-155], a malattie metaboliche [156,157], epatiti virali [158,159], malattie cardiovascolari [160-162], cancro [163-165] e anche a malattie neurodegenerative [166,167]. Le malattie autosomiche dominanti, tra cui la CMT2A, in cui la presenza di un solo allele mutato è sufficiente a causare la patologia, rappresentano un ottimo bersaglio di una strategia terapeutica basata su RNAi.

Negli ultimi anni, due differenti tipi di approcci sono stati generati. Il primo basato sul silenziamento esclusivamente dell'allele mutato. La sequenza di siRNA viene disegnata in modo da discriminare alterazioni in un singolo nucleotide, riconoscendo quindi la mutazione stessa o polimorfismi legati alla patologia (Fig 6) [168-174]. Questa strategia è stata applicata alla malattia di Alzheimer e alla malattia di Huntington con risultati molto promettenti [172].

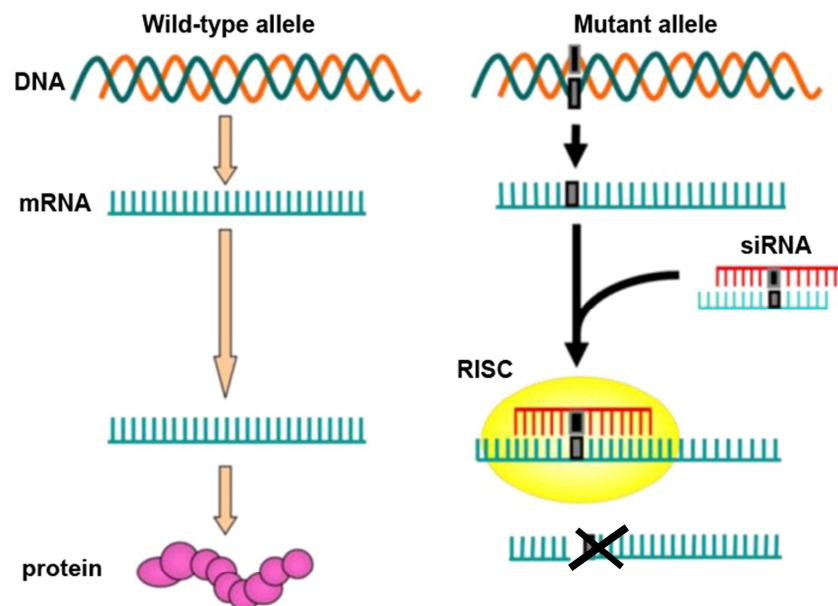


Figura 6. Silenziamento allele specifico mediante RNAi.

La mutazione del singolo nucleotide nell'allele mutato e nel suo trascritto è indicata dal box nero. La sequenza di siRNA viene disegnata in modo da riconoscere l'mRNA mutato e non quello wild-type. In questo modo, il complesso RISC-siRNA riconosce preferenzialmente l'allele mutato, ma non quello wild-type, inibendo così la sintesi della proteina mutata.

Riadattato da Hohjoh H., 2013.

In presenza, però, di alte concentrazioni di siRNA, la discriminazione tra l'allele wild-type e quello mutato non è sempre completa e quindi anche una quota dell'allele normale viene silenziata. Per ovviare a questo problema, è stata introdotta una modalità di silenziamento mediata da RNAi che prevede l'utilizzo di sequenze siRNA in grado di silenziare entrambi gli alleli. Per consentire l'espressione di livelli opportuni della proteina normale, viene utilizzato un mRNA modificato per resistere a tale processo di silenziamento [174,175]. Questa strategia è stata applicata, con buoni risultati, in modelli *in vitro* e in vivo di Atassia Spino Cerebellare di tipo 6 e di SLA [176,177]. Una schematica rappresentazione di questa strategia è mostrata nella seguente figura (Fig 7).

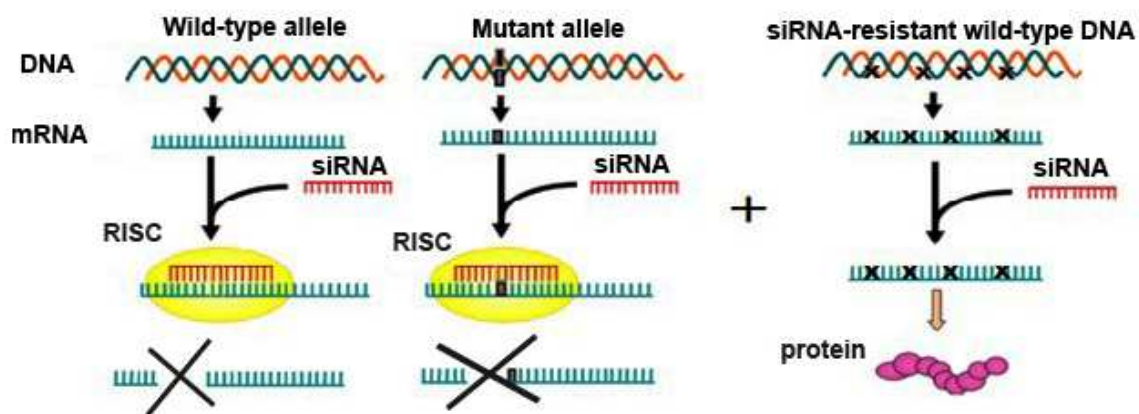


Figura 7. Nuova strategia di RNAi.

Piccole molecole di RNA in associazione al complesso RISC silenziano sia l'allele mutato sia l'allele wild-type. In parallelo, viene fornito il DNA/mRNA resistente al silenziamento mediato da siRNA in modo da ripristinare livelli opportuni della proteina wild-type.

Riadattato da Hohjoh H. *et al.*, 2013.

Se da un lato l'interesse in queste strategie è sempre maggiore, dall'altro le barriere da superare per la traslabilità clinica sono diverse, tra cui l'instabilità dei costrutti, la possibilità di generare effetti off-target o risposte immunitarie e la scelta di un efficiente veicolo di somministrazione [178].

Riguardo ai veicoli di somministrazione, ad oggi esistono sia veicoli non virali, come i liposomi e le nanoparticelle, sia veicoli virali come i lentivirus, i retrovirus e i vettori adeno associati.

1.4.3.1 I vettori adeno-virus associati come veicolo per la terapia genica

Il trattamento di malattie genetiche a carico del SNC è sicuramente complicato dalla natura impermeabile della barriera emato-encefalica e dal coinvolgimento contemporaneo di più regioni del cervello. L'uso di vettori di trasferimento genico in grado di distribuire il gene o la molecola correttiva a livello del cervello ha permesso di superare questa limitazione, consentendo un loro utilizzo non solo nella ricerca pre-clinica in modelli animali, ma anche come strategia terapeutica nell'uomo.

Tra i diversi vettori di trasferimento genico, i vettori adeno-virus associati (AAV) sono i vettori ideali. Essi sono in grado di trasdurre tipi cellulari differenti non in replicazione, di permettere una stabile espressione del transgene e non generano risposte infiammatorie o di citotossicità [179-185]. Gli AAV sono parvovirus con un genoma a DNA a singolo filamento di 4,7 Kb e un capsido con un diametro di 26 nm. Questi virus richiedono la co-infezione con un virus helper per portare a termine il ciclo di infezione. Ciascuna estremità del genoma a DNA a singolo filamento contiene una ripetizione terminale invertita (inverted terminal repeats, ITR) di 145 paia di basi, che è il solo elemento richiesto per la replicazione del genoma e per il suo impaccamento. Il loro genoma è costituito da due famiglie di geni, Rep, che codificano per le proteine coinvolte nella replicazione (Rep78, Rep 68, Rep 52 e Rep 40), e Cap, che codificano per le proteine del capsido (VP1, VP2 e VP3) [186,187]. Vettori ricombinanti adeno-associati funzionanti possono essere prodotti rimuovendo due geni virali (Cap e Rep) e inserendo la cassetta con il gene di interesse tra le due sequenze ITR. L'assenza di geni virali nei vettori AAV ricombinanti riduce la tossicità associata a questi vettori. Questo garantisce una notevole sicurezza nell'utilizzo di questi vettori perché impedisce la generazione di virus helper e minimizza la possibilità di reazione immunitarie dovute all'espressione di geni virali [180,188]. Anche se i vettori AAV si integrano specificatamente a livello del cromosoma 19, i vettori ricombinanti non hanno specifici siti di integrazione. La loro capacità di integrazione a livello del genoma è stata dimostrata, ma gli eventi di integrazione sono molto rari. La persistenza dei geni portati dai vettori AAV nei tessuti è principalmente attribuibile a genomi episomiali [189].

In questi ultimi anni, sono stati scoperti differenti sierotipi di AAV, che presentano una dimensione ed organizzazione del genoma molto simile, ma specificità di trasduzione di differenti tipi cellulari in relazione alla

presenza di proteine differenti a livello del capsido. L'identità a livello della sequenza amminoacidica della proteina del capsido dei diversi sierotipi di AAV è del 45%, con una notevole divergenza tra il sierotipo 4 e il 5. La variabilità tra i diversi sierotipi non è distribuita lungo tutta la sequenza di questa proteina, ma è concentrata a livello dei domini esterni localizzati sulla superficie [190]. Il vettore AAV maggiormente utilizzato è l'AAV di sierotipo 2 (AAV2) in grado di trasdurre le cellule del SNC solo nell'area adiacente al sito di iniezione, necessitando quindi di multiple iniezioni o di agenti come il mannitolo o l'eparina per un'estensione a più aree del SNC [191,192]. Il genoma del vettore AAV2 può essere impaccato in vettori AAV con sierotipo differente, dimostrando come la variazione del tropismo cellulare dipenda dalle proteine del capsido utilizzato [193,194].

Dopo i primi studi condotti con l'AAV2, i vettori AAV2 sono stati rapidamente utilizzati per le diverse applicazioni di terapia genica grazie alla loro assenza di patogenicità, elevata infettività e abilità di esprimere il transgene per un lungo periodo di tempo [195]. In particolare, questi vettori sono stati testati in diversi studi preclinici per patologie come la fibrosi cistica, la distrofia muscolare di Duchenne e l'artrite reumatoide [195]. Nonostante la sicurezza e l'efficacia di questi vettori negli esperimenti di trasferimento genico *in vivo*, molti studi non hanno mostrato un'adeguata espressione organo specifico del transgene. Da qui quindi gli studi successivi si sono concentrati sulla modificazione dei genomi del vettore e delle proteine del capsido per aumentare l'efficienza di trasduzione e/o la specificità dei vettori AAV2. Ad esempio, i vettori AAV2 self-complementary, sviluppati per superare il limite di sintesi del secondo filamento di DNA, mostrano, rispetto ai vettori convenzionali, un'aumentata capacità di trasduzione delle cellule nel fegato, nel muscolo, nel cervello e nella retina [182,195-200]. Altri gruppi si sono concentrati invece nel

cercare di manipolare, con tecniche di mutagenesi, le proteine del capsido [201,202]

Recentemente, il gruppo del Prof. Kaspar ha scelto di testare l'AAV con sierotipo 9 (AAV9). Questo vettore è in grado di trasferire in maniera efficiente un certo gene nel SNC dopo iniezioni sistemiche in modelli murini neonati con barriera ematoencefalica non completamente sviluppata e in topi adulti con barriera totalmente sviluppata. Il gruppo del Prof. Kaspar ha valutato l'espressione della green fluorescent protein (GFP), veicolata dal vettore AAV9, iniettato nella vena della faccia di topi neonati e nella vena della coda di topi adulti. Hanno osservato un'elevata efficienza di trasduzione dei gangli dorsali, dei MN spinali e dei neuroni del cervello nei topi neonati. Negli adulti, l'efficienza di trasduzione è stata maggiore negli astrociti a livello del midollo spinale e del cervello [203]. Anche in organismi più complessi come i primati, questi vettori sono in grado di trasdurre i MN, oltrepassando la barriera ematoencefalica [204]. Queste considerazioni hanno supportato l'idea di poter utilizzare questo vettore come veicolo di somministrazione di eventuali terapie geniche. Modelli murini di Atrofia Spinale Muscolare (SMA) trattati con AAV9 veicolante il gene survival motor neuron (*SMN*), che se mutato è responsabile della patologia, presentano un notevole incremento della sopravvivenza e un miglioramento della funzionalità neuromuscolare [205]. In parallelo, altri tre gruppi indipendenti hanno descritto una completa reversione del fenotipo in modelli murini di SMA, a seguito del trattamento con AAV9-SMN [206-208]. Risultati altrettanto soddisfacenti sono stati ottenuti anche in modelli murini di SLA. Il trattamento con AAV9 che veicola una sequenza di shRNA silenziante il gene superossido dismutasi 1 (*SOD1*), responsabile della patologia, causa una progressione più lenta della patologia stessa e un aumento della sopravvivenza del modello murino [209].

La terapia genica mediata da AAV9 potrebbe trovare una valida applicazione nelle diverse malattie genetiche, tra cui la CMT2A, attualmente incurabili.

2. SCOPO DEL LAVORO

La CMT2A, neuropatia assonale ereditaria causata da mutazioni del gene *MFN2*, rappresenta una delle più frequenti malattie neuromuscolari ereditarie. Attualmente, non esiste una terapia risolutiva per questa patologia.

Lo studio dei meccanismi responsabili di tale patologia così come l'identificazione di possibili terapie sono complicati dalla ridotta disponibilità di modelli *in vivo* e anche dalla difficoltà di ottenere modelli *in vitro* come neuroni motori e sensitivi umani, tipicamente affetti nella patologia. La possibilità di riprogrammare cellule somatiche mature in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) ha permesso di ottenere cellule paziente specifiche, utili come modello *in vitro* della patologia oltre che per testare possibili terapie geniche.

Scopo di questo studio è ampliare le conoscenze relative ai meccanismi molecolari responsabili della patologia attraverso la generazione di un modello *in vitro* della malattia e di sviluppare un possibile approccio terapeutico.

Questo progetto di ricerca è stato realizzato attraverso le seguenti fasi:

- generazione di un modello *in vitro* di CMT2A, mediante l'ottenimento di iPSC e motoneuroni paziente specifici;
- studio del network mitocondriale associato alla patologia in modelli *in vitro* (fibroblasti e motoneuroni CMT2A) e *in vivo* (MitoCharc1 mouse) della malattia per identificare biomarcatori del fenotipo patologico;
- identificazione di una terapia basata su RNA interference (RNAi) e validazione nel modello *in vitro* e *in vivo* della patologia.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Ottenimento di fibroblasti da pazienti CMT2A

Abbiamo reclutato 10 pazienti affetti da CMT2A (n=10). La diagnosi è stata confermata mediante analisi del gene *MFN2*. Le mutazioni identificate nel gene *MFN2* sono le seguenti: Lys357Glu [K357E] (n=1), Arg104Trp [R104W] (n=3 consanguinei), Ala283Val [A283V] (n=2 consanguinei), Ser249Cys [S249C] (n=1), Arg94Gln [R94Q] (n=1), Arg280His [R280H] (n=2 non consanguinei).

Abbiamo raccolto la storia clinica di ciascun paziente, principalmente in relazione all'età di insorgenza dei sintomi, i vari test funzionali [*i.e.* elettromiografia (EMG)/elettroencefalografia (ENG)] e i referti delle biopsie muscolari e del nervo.

Dopo aver ottenuto il consenso informato scritto, sono state eseguite le biopsie cutanee dei pazienti CMT2A (n= 10) utilizzate per la derivazione dei fibroblasti. Come controllo, sono stati utilizzati fibroblasti ottenuti da biopsie di volontari sani. L'espianto cutaneo delle dimensioni di circa 5 mm, prelevato dalla superficie del braccio mediante l'uso di punch per biopsia cutanea (Kai Industries) è stato frazionato in piccole porzioni e posizionato al centro di piastre da 10 cm. Dopo l'aggiunta del terreno di crescita, le piastre sono mantenute a 37°C. Il terreno è stato cambiato ogni 3-4 giorni. I fibroblasti sono visibili dopo 4-5 giorni d'incubazione e arrivavano a confluenza dopo circa 4 settimane. Una volta a confluenza, i fibroblasti sono staccati con l'aggiunta di tripsina-0.02% EDTA (Life Technologies), trasferiti in piastre da 10 cm e coltivati con il terreno di crescita. In ogni esperimento sono state utilizzate cellule prima dell'ottavo passaggio.

Gli espianti cutanei e i fibroblasti dei pazienti CMT2A sono stati cresciuti in F-10 Nutrient mixture medium (F10; life technologies), arricchito di siero fetale bovino (15% FBS; Sigma), sodio piruvato (1,2%, Sigma), L-glutamina (1%,Sigma), penicillina/streptomina (1%; Sigma), fungizone (0,4%,

Sigma), gentamicina (0,1%, Sigma), fattore di crescita dell'epidermide (0,05% EGF; Sigma), fetuina, albumina e insulina (3mM, Sigma). Le biopsie e i fibroblasti dei soggetti controllo sono stati allevati in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma), con l'aggiunta di siero fetale bovino (15%FBS; Sigma), penicillina/streptomycin (1%; Sigma) e fungizone (1%; Sigma).

In tutti gli esperimenti successivi, sono stati utilizzati i fibroblasti di un paziente CMT2A con mutazione A283V (CMT2A) e come controllo i fibroblasti di un volontario sano (WT).

3.2 Produzione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) e differenziamento in motoneuroni (MN)

3.2.1 Generazione di iPSC con metodo virale

Per la riprogrammazione virale, abbiamo co-infettato i fibroblasti cutanei di un paziente CMT2A (A283V) con quattro vettori "Sendai Virus", ciascuno in grado di esprimere uno dei quattro fattori sufficienti per un'efficiente riprogrammazione (CytoTune™hOct3/4 Sendai, CytoTune™hSox2 Sendai, CytoTune™hKlf4 Sendai e CytoTune™hc-Myc Sendai; CytoTune™-iPS Reprogramming Kit, Life Technologies) [131,132,210]. I fibroblasti cutanei sono stati seminati in 2 pozzetti di una costar da 6 pozzetti ad una densità di 5×10^5 cellule per pozzetto e coltivati per due giorni in modo da raggiungere una confluenza del 90%. Il giorno della trasduzione, nel terreno di crescita sono stati aggiunti 50 µl di ciascun vettore virale. 24 ore dopo la trasduzione, il medium è stato sostituito con il terreno di crescita dei fibroblasti. Le cellule sono state allevate per 6 giorni, cambiando il medium di crescita ogni giorno. Dopo 7 giorni dalla trasduzione, i fibroblasti sono stati rimossi meccanicamente attraverso l'uso di 0.05%tripsina/EDTA (Life Technologies) e seminati ad una densità di 5×10^4 su piastre da 10 cm di fibroblasti embrionali murini (MEF CF-1 ATTC, densità 1.5×10^6) e

mantenuti nel terreno di crescita dei fibroblasti. Dopo 24 ore, il medium di crescita è stato sostituito con il terreno per le hESC (mTeSR, Stem Cell Inc.). Le colonie con morfologia simile a quella di hESC sono diventate visibili 4 settimane dopo la trasduzione. Le colonie di iPSC sono state piccate e trasferite in una nuova costar da 24 pozzetti in cui sono stati precedentemente seminati i MEF ad una densità di 5.0×10^4 per pozzetto. Dopo 48 ore dal trasferimento, il medium di crescita è stato cambiato. Le colonie di iPSC (iPSC-CMT2A) sono state espanse e successivamente isolate per l'analisi.

È stata eseguita l'analisi cromosomica standard G-banding. Come conferma del fatto che i cloni di iPSC derivavano dai fibroblasti cutanei appartenenti ai soggetti in studio, è stata eseguita l'analisi delle brevi ripetizioni in tandem (STR). Abbiamo verificato la capacità delle iPSC prodotte di generare corpi embrioni *in vitro* e di formare teratomi *in vivo* [136].

3.2.2 Differenziamento di iPSC in MN

Abbiamo generato motoneuroni (MN-CMT2A) mediante un protocollo già validato nel nostro laboratorio [136]. Per la produzione dei MN, le iPSC ottenute da fibroblasti CMT2A sono state piastrate in un terreno neuronale che consisteva in DMEM/F12 (Gibco, Invitrogen), aminoacidi non essenziali (MEM), N2 ed eparina (2 µg/ml; Sigma-Aldrich). Dopo 10 giorni, è stato aggiunto AR (0.1 µM, Sigma-Aldrich) per la caudalizzazione neurale. Una settimana dopo (al giorno 17), sono state isolate le cellule neuroectodermiche posteriorizzate. Questi cluster neuroepiteliali sono stati risospesi nello stesso terreno neuronale in presenza di AR (0.1 µM) e Shh (100–200 ng/ml; R&D Systems Inc.) per una settimana. Al giorno 24, sono stati aggiunti i fattori di crescita brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial-derived neurotrophic factor (GDNF), e insulin-like growth factor-1 (IGF1) (10 ng/ml; Peprotech). Come controllo, lo stesso protocollo è stato

utilizzato per il differenziamento motoneuronale di una linea di iPSC (MN-WT), precedentemente generata nel nostro laboratorio da fibroblasti di un volontario sano [136].

3.3 Modello murino di CMT2A

Come modello murino di CMT2A, sono stati utilizzati i topi MitoCharc1 (B6;D2-Tg(Eno2-MFN2*R94Q)L51Ugfm/J) [70]. In questo modello murino, il transgene è costituito dal c-DNA del gene *MFN2* umano, la cui espressione è regolata da un'enolasi neurone specifica. L'amminoacido Arginina (R) in posizione 94 della proteina MFN2 è sostituito dall'amminoacido Glutamina (Q), in modo da mimare una delle più comuni mutazioni identificate nei pazienti CMT2A [211]. Il transgene è stato microiniettato nel pronucleo maschile degli oociti murini fecondati B6D2F1. I topi così ottenuti sono stati incrociati con topi controllo C57BL/6J per generare la colonia. Il modello murino MitoCharc1, proposto nel lavoro di Cartoni mostra difficoltà motorie e una variazione della dimensione degli assoni mielinizzati correlata ad un incremento del numero dei mitocondri in questi assoni a partire dai 5 mesi di età [70]. Tutti i topi transgenici sono stati ottenuti dal laboratorio della Jackson (The Jackson Laboratory, CA USA). Gli esperimenti *in vivo* sono stati approvati dal comitato etico dell'Università degli Studi di Milano e del Ministero della Salute, in accordo con le linee guida del US National Institutes of Health. Come controllo, sono stati utilizzati topi C57BL/6J (Non-Tg).

3.3.1 Protocollo per il genotipaggio

I topi sono stati genotipati tramite PCR su DNA genomico [70], ottenuto dalla biopsia della coda. Al giorno della nascita (P=0), dalla coda dei topi sono stati tagliati 2 mm di tessuto. Per l'estrazione del DNA, il tessuto è stato trattato con NaOH (50 mM), successivamente riscaldato in un termociclatore a 95°C per 10 minuti e infine alla soluzione è stato aggiunto

TrisCl pH 8.0 (1 M). Il transgene è stato individuato utilizzando i primer e le condizioni di PCR descritte dal gruppo di Cartoni [70]. Il prodotto di PCR è stato caricato su gel di agarosio all'1,5% e l'elettroforesi è eseguita a 100 V per 15 minuti. La banda del transgene è di 300bp e quella relativa al controllo interno positivo è di 200 bp. Con questa metodica non è possibile distinguere gli animali transgenici emizigoti da quelli omozigoti.

3.3.2 Analisi della funzionalità motoria e della sopravvivenza

I topi MitoCharc1 sono stati seguiti giornalmente per individuare i sintomi della malattia. L'analisi della funzionalità motoria è stata valutata mediante rotarod test con un incremento graduale di accelerazione (4–40 rpm Rota-Rod 7650; Ugo Basile, Comerio, Italy). Il tempo di permanenza sullo strumento di ciascun animale è stato opportunamente valutato [88].

La mortalità di ciascun animale è stata registrata. Come controllo, sono stati utilizzati topi C57BL/6J (Non-Tg). Per il confronto della sopravvivenza è stata utilizzata l'analisi Kaplan-Meier e il log-rank test. I risultati delle analisi del rotaroad test sono stati condotti tramite ANOVA e un'analisi Tukey's post-hoc.

3.4 Costruzione e validazione dei vettori per la terapia genica

3.4.1. Costruzione dei vettori per l'espressione di "shRNA"

Per il silenziamento del gene *MFN2*, mediato da short harpin RNA (shRNA), sono state identificate le due migliori sequenze target mediante l'utilizzo di specifici algoritmi (dharmacon.com):

Target 1: 5'-CCTCAAGGTTTATAAGAAT-3'

Target 2: 5'-GCAAAGCTGCTCAGGAATA-3'

Le sequenze target 1 e 2 sono state sintetizzate da Origene Technologies, Inc. (Origene Technologies, Inc Rockville, MD, USA). Per l'espressione degli shRNA nelle cellule umane, è stato utilizzato il vettore pSUPERpuro (Fig 8; OligoEngine Seattle) [212]. Ciascuna delle sequenze target (target 1

e target2) con orientamento senso e antisense è stata clonata nel vettore pSuper.puro tra i siti di restrizione *Bgl*III e *Hind*III, come oligonucleotidi a doppio filamento, separate da uno spaziatore di 9 nucleotidi in modo da formare una struttura a forcina. I vettori generati sono identificati con la seguente terminologia: shRNA_{Atg1} e shRNA_{Atg2}.

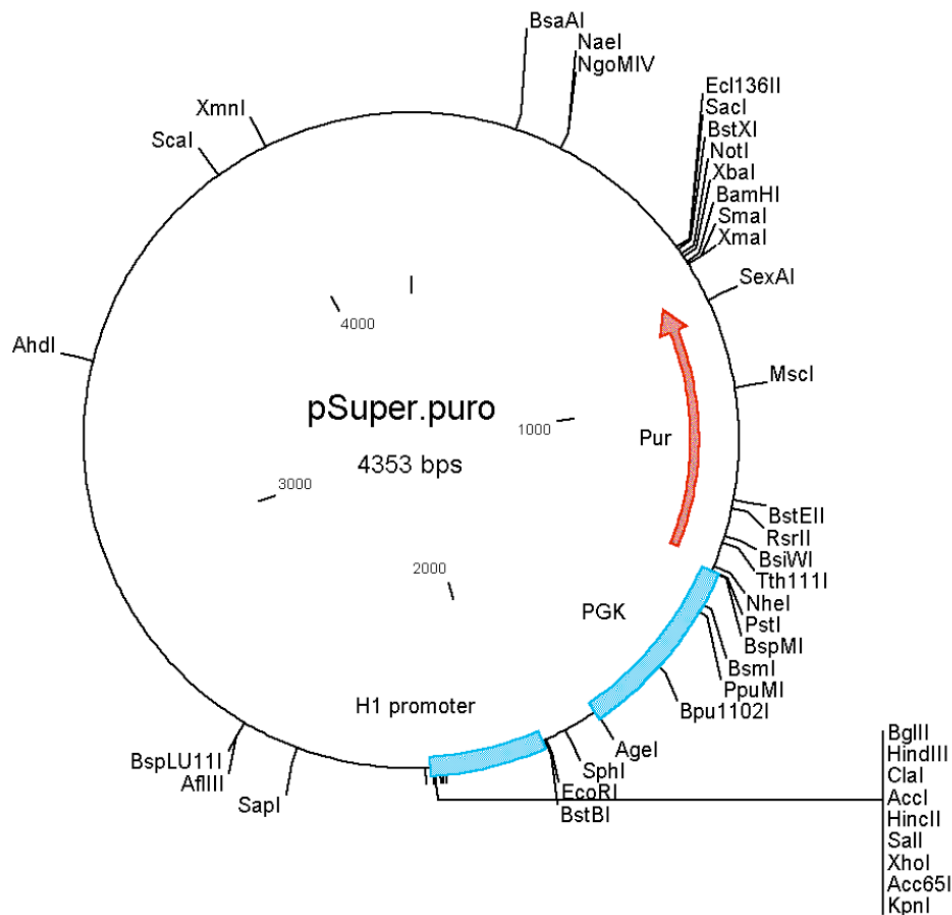


Figura 8. Mappa del vettore pSuper.puro.

Il protocollo utilizzato per la preparazione dei due vettori (shRNA_{Atg1} e shRNA_{Atg2}) è stato il seguente. Le sequenze di DNA target 1 e 2 sono state risospese in acqua sterile ad una concentrazione di 3 mg/ml. 1 µl di ciascun oligonucleotide (senso e antisense) è stato risospeso in 48 µl di buffer (100 mM NaCl e 50 mM HEPES pH 7.4) e incubati a 90°C per 4 minuti, quindi a 70°C per 10 minuti. 1 µl del vettore è stato linearizzato mediante digestione

con gli enzimi di restrizione Bgl II e Hind III ad una temperatura di 80°C per 20 minuti. Una volta ultimata la digestione, è stata condotta la purificazione del vettore linearizzato su gel di agarosio 1%. Per la ligazione, 2 µl degli oligonucleotidi annilati, 1µl of di buffer per la DNA ligasi T4, 1µl del vettore, 5µl di H₂O, e 1µl di DNA ligase T4 sono stati assemblati e incubati tutta la notte a temperatura ambiente. Come controllo negativo, è stato utilizzato il vettore linearizzato senza inserto (SCR). I vettori ricombinanti sono stati propagati nelle cellule ultracompetenti di *E.Coli* XL10-Gold (Stratagene, La Jolla, CA). I vettori sono stati verificati mediante analisi di PCR e sequenziamento diretto nelle varie fasi della loro realizzazione.

3.4.2 Costruzione dei vettori per l'espressione di MFN2R

La mutagenesi in più siti è stata effettuata a partire dal cDNA del gene MFN2 wild-type, inserito nel plasmide pCMV6-Entry (OriGene Technologies, Fig 9), mediante PCR utilizzando QuikChange Lightning Multi-site-directed Muutagenesis Kit (Agilent Technologies) [213-216]. Sono state allestite, in parallelo, due diverse reazioni di PCR di mutagenesi ognuna con oligonucleotidi complementari al DNA da mutagenizzare, ad eccezione dei nucleotidi interessati dalla mutazione. Sono stati così generati due costrutti: uno resistente a shRNA_{tg1} (MFN2R_{tg1}) e l'altro resistente a shRNA_{tg2} (MFN2R_{tg2}). I prodotti di PCR sono trattati con Dpn I per 5 minuti a 37°C, in modo da digerire il DNA parentale non mutato. I vettori ricombinanti sono stati propagati nelle cellule ultracompetenti di *E.Coli* XL10-Gold (Stratagene, La Jolla, CA). La presenza delle mutazioni è stata verificata mediante sequenziamento diretto (Big Dye terminator 3.1 sul ABI 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

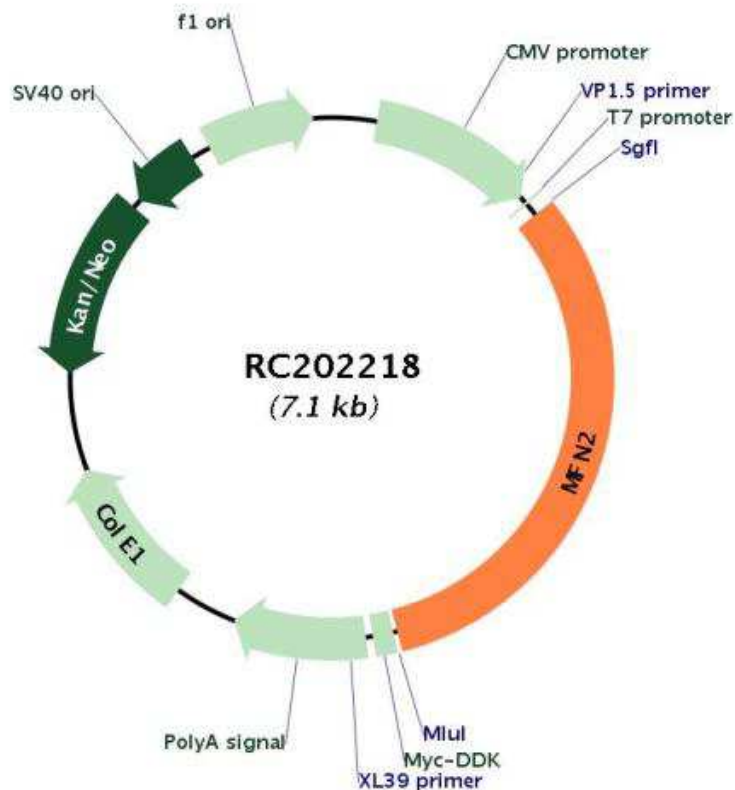


Figura 9. Mappa del vettore pCMV6-Entry.

3.4.3 Protocollo di trasfezione dei vettori *in vitro*

Le cellule sono state seminate ad una confluenza del 60-70% in piastre da 10 cm. Il giorno successivo, le cellule sono state transfettate con shRNA_{tg1} (7.5 µg) o con shRNA_{tg2} (7.5 µg), utilizzando il reagente Lipofectamine LTX (LifeTechnologies). In parallelo sono stati allestiti anche esperimenti di cotrasfezione con shRNA_{tg1}/MFN2R_{tg1} (7.5 µg) o con shRNA_{tg2}/MFN2R_{tg2} (7.5 µg) in rapporto 1:1 o 1:3. Come controllo, le cellule sono state transfettate con il vettore SCR nelle stesse condizioni. Dopo 24h le cellule sono cresciute in presenza di 1,5 µg/ml di puromicina e di 500 µg/ml di G418 (Sigma). Le cellule sono state raccolte a 72h per il dosaggio dei livelli della proteina MFN2 mediante analisi di western blot.

3.4.4 Generazione dei vettori AAV9

I vettori AAV9 sono stati costruiti e prodotti dalla ditta SignaGen Laboratories, (SignaGen Laboratories, Rockville, MD). Il plasmide shRNA_{tg2} è stato utilizzato per generare il vettore self-complementary scAAV9-shRNA_{tg2} (Fig 10a), contenente la sequenza shRNA_{tg2} silenziante il trascritto del gene *MFN2*. Il plasmide MFN2R_{tg2} è stato invece utilizzato per generare il single-stranded ssAAV9-MFN2R_{tg2}. Esso contiene il c-DNA del gene MFN2 mutagenizzato (Fig 10b). In entrambi i costrutti virali è presente il gene reporter codificante per la proteina GFP. L'espressione delle sequenze di interesse e del gene reporter è regolata dal promotore del citomegalo virus (CMV) (Fig 10 a,b). Una volta prodotti i costrutti virali, essi sono stati impaccati in particelle virali AAV9 (SignaGen Laboratories, Rockville, MD). I plasmidi AAV sono stati trasfettati con il genoma virale ricombinante nelle cellule HEK293 insieme ai plasmidi richiesti per l'impaccamento virale. 72 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state raccolte e lisate. Il virus è stato purificato mediante protocolli di purificazione a gradiente di densità CsCl. I vettori sono stati verificati mediante PCR quantitativa. La purezza dei preparati è stata verificata mediante elettroforesi su gel (SignaGen Laboratories, Rockville, MD). Lo stock originale per ciascun costrutto virale era di 10¹³ GC/ml.

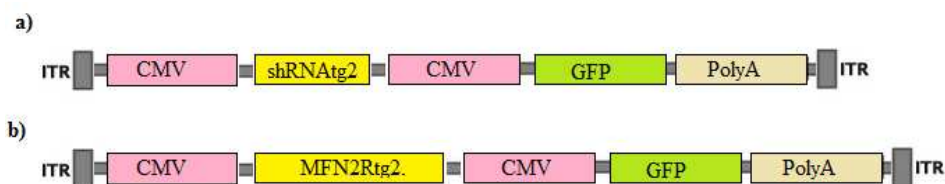


Figura 10. Vettori scAAV9-shRNA_{tg2} e ssAAV9-MFN2R_{tg2}.

Rappresentazione schematica del vettore scAAV9-shRNA_{tg2} (a) e del ssAAV9-MFN2R_{tg2} (b). CMV, promotore del citomegalo virus; GFP, c-DNA del gene codificante per la proteina fluorescente verde; PolyA, coda di polyA dell'SV40; ITR, sequenze terminali invertite.

3.4.5 Protocollo di somministrazione dei vettori AAV9

I topi MitoCharc1 (n=3 animali per condizione) sono stati iniettati con AAV9-GFP, scAAV9-shRNA^{tg2} o ssAAV9-MFN2R^{tg2}, iniziando con la concentrazione virale usata per il trattamento dei topi SMA (5×10^{11} genomi). Sono stati testati differenti protocolli di somministrazione sistemica o intracerebroventricolare il giorno della nascita (P0), in associazione ad una somministrazione cutanea al terzo giorno di vita (P3). L'iniezione nella vena facciale (somministrazione sistemica) è stata realizzata come descritto [203]. Si utilizza un microscopio ottico per visualizzare la vena temporale (localizzata subito anteriormente all'orecchio). La soluzione contenente il vettore è adattata per una siringa da insulina. L'ago viene inserito nella vena e lo stantuffo premuto a mano. Le particelle virali DNasi resistenti sono contenute in un volume totale di 100 μ l di un buffer di fosfato salino addizionato con 0.001% Pluronic-F68. Per quanto riguarda l'iniezione intracerebroventricolare, il cucciolo, dopo essere stato crioanestetizzato, è stato posizionato controluce per visualizzare l'intersezione della sutura cranica coronale e quella sagittale. Un ago capillare per iniezioni è stato posizionato 1 mm lateralmente e 1 mm posteriormente al bregma, e in seguito inserito ad 1 mm di profondità nel bordo ipsilaterale del ventricolo posteriore. Le iniezioni sottocutanee nei cuccioli a P0 e a P3 sono state eseguite come precedentemente descritto [217]. Per verificare l'efficienza dei costrutti, abbiamo iniettato 10 μ l AAV9-shRNA^{tg2} e dell'AAV9-MFN2R^{tg2} nel muscolo gastrocnemio di topi adulti Non-Tg (5 mesi).

3.5 Analisi immunocitochimica

I mitocondri sono stati marcati nei fibroblasti (CMT2A, WT) e nei motoneuroni (MN-CMT2A, MN-WT) con uno staining con MitoTracker Red 150 nM (Life Technologies) per 30 minuti a 37°C. Per il doppio

immunostaining, le cellule sono state lavate con PBS e poi fissate per 20 minuti con paraformaldeide al 4%. Dopo un lavaggio in PBS, le cellule sono state permeabilizzate con Triton X-100 allo 0.1% per 5 minuti e poi trattate per 30 minuti con siero di capra a 10% (Zymed, South San Francisco, CA). Le cellule sono state incubate con anticorpo monoclonale specifico per le proteine di interesse con BSA al 3% per 1 ora. In seguito sono state lavate 4 volte con PBS–0.1% Triton X-100 e poi incubate per 1 ora con l'anticorpo secondario coniugato ai marcatori Alexa Fluor (Molecular Probes/Invitrogen). Dopo altri 4 lavaggi con PBS–Triton X-100, le cellule sono state marcate con DAPI (Molecular Probes/Invitrogen). Le immagini sono state acquisite con microscopio confocale SP2 AOBS. Le analisi di immunocitochimica delle iPSC e dei MN sono state condotte come precedentemente descritto (Corti et al., 2008; 2009,2012).

Gli anticorpi primari utilizzati sono i seguenti: SSEA-3 (1:100, R&D), TRA1-60 (1:500, Chemicon), TRA1-81 (1:500, Chemicon), NANOG (1:500 Abcam), ChAT (1:200, Millipore) e SMI-32 (Covance, 1:500). I neuroni sono stati contati e la crescita assonale misurata come descritto in precedenza [85] e successivamente analizzati mediante NIH Image Software. I calcoli statistici sono stati eseguiti utilizzando software StatsDirect.

3.6 Analisi del potenziale di membrana

Le alterazioni del potenziale a livello delle membrane mitocondriali sono state analizzate con uno staining con 5,5',6,6'-tetracloro-1-1',3,3'-tetraetilbenzimidazoloicarbianine iodide (JC-1; Mitochondria Staining Kit, Sigma). In assenza di alterazioni del potenziale della membrana mitocondriale, il colorante si concentra nella matrice mitocondriale dove si formano aggregati che emettono fluorescenza rossa (aggregati di JC-1). In presenza di alterazioni del potenziale di membrana, il colorante si disperde in tutta la cellula e si osserva uno shift della fluorescenza dal rosso al verde

per la presenza di monomeri di JC-1. I fibroblasti (CMT2A, WT) e i motoneuroni (MN-CMT2A, MN-WT) sono stati seminati e il giorno successivo i mitocondri sono stati marcati con 25 μ l di JC-1 diluito nel terreno di crescita per 20 minuti a 37°C. Come controllo, prima dello staining con JC-1, le cellule sono state trattate con Valinomicina (Sigma), che dissipa il potenziale elettrochimico a livello mitocondriale, prevenendo quindi l'accumulo di aggregati di JC-1. La fluorescenza è stata acquisita in microscopia confocale Leica LCS2.

3.7 Real time RT-PCR

La quantificazione del mtDNA e la valutazione della sua integrità sono state condotte mediante saggi di Real Time (RT-PCR). L'estrazione di DNA (fibroblasti, iPSC, MN) e da tessuti murini (cervello, muscolo, midollo spinale, nervo sciatico) è stata condotta secondo metodiche standard.

La quantificazione del mtDNA è stata determinata mediante Real Time PCR (RT-PCR), utilizzando il metodo $\Delta\Delta C_t$ (7500 Real Time PCR; Software 2.01, Applied Biosystems, Foster City, CA). Per gli esperimenti su cellule umane, sono state utilizzate sonde per il gene mitocondriale umano *CYTB* e per il gene nucleare normalizzatore *APP*. L'integrità del mtDNA è stata valutata mediante saggio Taqman con sonde per i geni mitocondriali *ND4* e *ND1*. Negli esperimenti su tessuti murini sono state utilizzate sonde per il gene mitocondriale *ND1* e per il gene nucleare *TFRC*. Tutte le quantificazioni sono state condotte in quadruplicato utilizzando 25 ng del DNA totale come template. La quantità di mtDNA è stata normalizzata rispetto al DNA nucleare ed espressa sottoforma di valori relativi, considerando l'ammontare del mtDNA estratto come valore di riferimento pari a 1.

3.8 Long range PCR

La presenza di delezioni a livello del mtDNA è stata valutata mediante Long Range-PCR. In questa reazione, come primer, sono stati utilizzati due oligonucleotidi (forward mt5677 and reverse mt16135), che fiancheggiano una regione del mtDNA in cui le delezioni sono molto frequenti. Il DNA estratto secondo metodiche standard da lisati cellulari (fibroblasti, MN) è stato utilizzato come template. La reazione di PCR è stata condotta seguendo il seguente protocollo (Expanded Roche): 5 µl di Buffer (10X), 4 µl di dNTPs (2.5 M), 0.5 µl di Taq Polymerase Expand Roche (5U/µl), 1 µl di primers mix (mt5677fw- mt16135rc, 30 pmol/µl), 500 ng di DNA e H₂O in un volume finale di 50 µl. Il protocollo di amplificazione è riassunto nella seguente tabella (Tab 3).

Process	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	94°C	2 minutes	
Denaturation	94°C	20 seconds	7
Annealing	65-58°C	30 seconds	
Extension	68°C	8 minutes	
Denaturation	94°C	20 seconds	18
Annealing	58°C	30 seconds	
Extension	68°C	8 min 20 sec	
Final extension	68°C	7 minutes	
	15°C	∞	

Tabella 3. Protocollo di amplificazione del mtDNA.

In seguito a corsa elettroforetica su gel di agarosio (1.2%), la comparsa di bande multiple (da 500 bp a 2000 bp) evidenziano la presenza di genomi mitocondriali privi di regioni di differenti dimensioni. Bande con peso molecolare inferiore evidenziano processi di amplificazione e corrispondono a più molecole di mtDNA deleto.

3.8 Indagini biochimiche

L'attività di alcuni enzimi della catena respiratoria è stata dosata mediante saggi spettrofotometrici condotti su lisati cellulari (fibroblasti e MN) e su omogenati di tessuto (nervo sciatico).

I fibroblasti (CMT2A, WT) e MN (CMT2A, WT) sono stati raccolti e centrifugati per 10 minuti a 1500 xg. Le proteine sono state estratte dopo sonicazione nel buffer di risospensione (KCl 120mM, HEPES 20mM, MgCl₂ 5mM, EDTA 1mM; pH7.2). Per determinare la concentrazione proteica è stato utilizzato il metodo di Lowry che prevede che la miscela da saggiare venga portata in ambiente alcalino (pH 10-10.5) e fatta reagire con citrato o tartrato di rame. Successivamente si formano dei complessi rame-proteine, quindi si aggiunge la miscela di Folin-Ciocalteu, costituita da sodio molibdato, fosfato e tungstato. Nel tempo si sviluppa una colorazione che tende al blu in presenza di proteine. L'intensità della colorazione è proporzionale alla concentrazione proteica.

Le attività specifiche di ogni complesso sono state normalizzate a quella della Citrato Sintetasi (CS), utilizzato come controllo interno perché indice del numero di mitocondri presenti nel campione. Tale enzima catalizza la prima reazione del Ciclo di Krebs cioè la condensazione dell'ossalacetato e dell'acetil-CoA a dare citrato.

NADH deidrogenasi (NADH DH): al medium composto da buffer K-fosfato (0,1M; pH 7.5), ferricianide (0,01M), NADH (2mM), sono aggiunti 10 µl di campione. La lettura spettrofotometrica viene condotta a 340 nm a 30°C.

Succinato deidrogenasi (Succ DH): al medium composto da buffer K-fosfato (0,1M; pH 7), succinato (400mM), 2-6clorofenolo-indofenolo (0,015%), KCN (15Mm), sono aggiunti 10 µl di campione. La lettura spettrofotometrica viene condotta a 600 nm a 30°C.

Complesso II (succinato-coenzima Q ossido reduttasi): al medium composto da buffer K-fosfato (0,1M; pH 7), succinato (400mM), 2-

6clorofenolo-indofenolo (0,015%), KCN (15mM), Coenzima Q1 (3 mM) sono aggiunti 10 µl di campione. La lettura spettrofotometrica viene condotta a 600 nm a 30°C.

Complesso I + III (NADH-citocromo c riduttasi): al medium composto da buffer K-fosfato (0,1M; pH 7.5), NADH (2mM), KCN (10mM), citocromo c (1mM), sono aggiunti 10 µl di campione. La lettura spettrofotometrica viene condotta a 550 nm a 30°C.

Complesso II + III (succinato-citocromo c riduttasi): al medium composto da buffer K-fosfato (0,1M; pH 7.5), succinato (200mM, pH7.4), KCN (10mM), citocromo c (1mM), sono aggiunti 15 µl di campione. La lettura spettrofotometrica viene condotta a 550 nm a 30°C.

Complesso IV (citocromo c ossidasi): al medium composto da buffer K-fosfato (0,1M; pH 7), citocromo c ridotto (1%), sono aggiunti 10 µl di campione. La lettura spettrofotometrica viene condotta a 550 nm a 30°C.

Citrato sintetasi (CS): al medium composto da DTNB (1mM), Tris-HCl (pH 8,1), AcetilCoA (10mM), ossalacetato (10mM), sono aggiunti 10 µl di campione. La lettura spettrofotometrica viene condotta a 412 nm a 30°C.

L'attività della CS è stata valutata spettrofotometricamente anche su omogenati di tessuto derivati dal nervo sciatico murino per avere una stima della quantità di mitocondri. Il nervo sciatico, conservato a -80°C, è stato omogeneizzato in 50mM TRIS-HCl, 150mM KCl, con diluizione 1:10 e centrifugato per 10 minuti a 1600 rpm. Il surnatante è stato utilizzato per valutare le analisi biochimiche come descritto sopra.

3.9 Western blot

Le analisi di western blot sono state condotte su estratti cellulari (HeLa, fibroblasti, MN) e su tessuti murini (cervello, fegato, nervo sciatico).

Le cellule sono state raccolte e centrifugate. I pellet di cellule sono stati lisati a freddo per 10 minuti nel buffer con 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150

mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10% glicerolo, 1% Triton X-100, 100 mM NaF, e 2.5 mM di pirofosfato di sodio con aggiunta di protease inhibitor cocktail e phosphatase inhibitor cocktail (Pierce, Rockford, IL). Il lisato è stato purificato mediante centrifugazione a 13,500 rpm per 20 minuti a 4°C. La concentrazione proteica è stata determinata mediante BCA assay con uso di BSA standard (Pierce, Rockford, IL). 90 µg di proteina sono stati separati tramite 10% SDS-PAGE e poi trasportati mediante elettroforesi all'interno delle membrane di nitrocellulosa. E' stata eseguita una prima incubazione con anticorpi monoclonali anti-MFN2 (1:15,000, Millipore), anti- α -actina (1:250, Sigma), anti-FLAG (1:1000, Sigma), anti- α -SmB/B' (1:250, Sigma), anti-porina (1:1500, Life Technologies) e successivamente è stato utilizzato un anticorpo secondario coniugato ai marcatori Alexa Fluor o a una perossidasi (Molecular Probes/Life Technologies). Le proteine sono state visualizzate mediante reagenti chemiluminescenti (Amersham, Piscataway, NJ) o mediante fluorescenza. L'analisi densitometrica è stata eseguita con Image J software e i risultati sono stati analizzati con ANOVA e metodo Tukey's post-hoc.

Per le analisi di western blot su tessuto, 20 mg di tessuto sono stati congelati, polverizzati in azoto liquido e omogeneizzati in 0,4 ml di sample buffer contenente 2% (w/v) di SDS, 10% (v/v) di glicerolo, 50 mM Tris-HCl (pH 6,8), e 0,1 M DTT. I campioni proteici sono separati mediante SDS-PAGE 12% ed "elettroblottate" su membrane di nitrocellulosa e processati come descritto sopra.

3.10 Analisi di microscopia elettronica del nervo sciatico

3.10.1 Preparazione dei campioni

I nervi sciatici, prelevati dagli animali sacrificati mediante dislocazione cervicale preceduta da anestesia con etere, sono stati fissati per immersione in una soluzione di glutaraldeide 2.5% in tampone cacodilato

0.1 M e pH 7.4, per un periodo di 2 ore; dopo essere stati lavati in tampone cacodilato, sono stati in seguito post-fissati in tetrossido di osmio 2% overnight a 4°C. Successivamente i nervi sono stati sottoposti al protocollo di inclusione in resina epossidica attraverso una disidratazione progressiva per immersione in etanolo a concentrazioni crescenti: 25%-50% per 5', 70%-80% per 10', 95% 2 passaggi di 10', 100% 3 passaggi di 20'. I campioni sono stati quindi inclusi in resine epossidiche (Miscela Spurr, Electron Microscopy Sciences). Il passaggio dall'etanolo alla resina è mediato da passaggi in acetone, successivamente ai quali si è proceduto con l'infiltrazione graduale in resina. Al termine dell'incubazione nelle miscele di resina, i campioni di nervo sciatico sono stati disposti in resina pura in apposite formelle, mantenendo un orientamento tale da ottenere successivamente sezioni trasversali del campione, e sono stati posti in stufa a 72°C overnight per permettere la polimerizzazione della resina. I campioni inclusi sono stati tagliati attraverso l'uso dell'ultramicrotomo Power Tome XL (RMC Products), per la preparazione di sezioni semifini ed ultrafini. Le sezioni semifini, dello spessore di 1.5 µm, sono state adagate su gocce d'acqua poste su un vetrino porta-oggetto e lasciate aderire su piastra calda, per poi essere colorate con blu di toluidina e montate con un vetrino copri-oggetto in DPX. Le sezioni ultrafini, dello spessore di circa 800 Å, sono state raccolte su apposite griglie e contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo, per poi essere esaminate e fotografate al microscopio elettronico EM109 Zeiss.

3.10.2 Analisi morfologica e morfometrica

L'analisi morfometrica del nervo sciatico è stata effettuata acquisendo immagini delle sezioni di nervo ad alta risoluzione attraverso una fotocamera digitale e il software LAS (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Con il programma Image J si è proceduto poi alla conta delle fibre mieliniche, necessario per il calcolo della densità mielinica, e alla

misurazione semi-automatica del perimetro e delle aree degli assoni presenti nell'immagine acquisita.

3.10.3 Analisi del numero dei mitocondri

Il numero dei mitocondri contenuto negli assoni è stato determinato mediante l'osservazione di sezioni ultrafini al microscopio elettronico EM109. Gli assoni sono stati divisi in 2 gruppi in base al loro diametro minori o maggiori di 3,5 μm . Per ogni assone è stato contato il numero di mitocondri presenti. Per ogni topo sono stati considerati circa 100 assoni, in modo da avere un ugual numero di assoni piccoli e grandi.

3.11 Analisi dei tessuti mediante immunoistochimica

Gli animali sono stati sacrificati a differenti time point e fissati con paraformaldeide al 4%. Il midollo spinale è stato isolato e immerso in paraformaldeide per 4 ore, poi in saccarosio al 20% overnight e infine congelato con azoto liquido. I tessuti sono stati crio-sezionati. Tutte le sezioni sono state incubate con l'1% di FCS in PBS e trattate con 0.25% di Triton X-100. Le sezioni sono state analizzate valutando l'espressione della GFP. Il tessuto è stato incubato con l'anticorpo primario anti-SMI32 (1: 200 Covance) a 4°C overnight e successivamente secondario anti-mouse coniugato con RPE (1:200; Jackson ImmunoResearch e Dako) per 1 ora a temperatura ambiente.

I tessuti muscolari (vasto) prelevati immediatamente dopo il sacrificio sono stati congelati in isopentano preraffreddato in azoto liquido e montati su appositi supporti mediante resina OCT per il taglio al criostato.

I campioni sono stati studiati con le metodiche istologiche ed istochimiche standardizzate (Dubowitz, 1985): Ematossilina Eosina, Citocromo C ossidasi. Per la reazione citocromo c ossidasi sono state tagliate delle sezioni dello spessore di 8 μm che sono state raccolte su vetrini coprioggetto. Le sezioni sono state quindi incubate al buio per 2 h in stufa a

37 °C gradi con un medium così preparato: (20 mg di DAB (diaminobenzidina) sciolti in 10 ml di tampone fosfato 50 mM pH 7.4, a cui sono stati aggiunti 20 mg di catalasi e 20 mg di citocromo c, pH 7.4).

Dopo un lavaggio con acqua le sezioni vengono infine montate sui vetrini in gel di glicerina ed esaminate al microscopio ottico.

4. RISULTATI

4.1 Ottenimento di fibroblasti da pazienti CMT2A

Abbiamo reclutato 10 pazienti affetti da CMT2A, la cui diagnosi è stata confermata mediante analisi del gene *MFN2*. Le mutazioni identificate in questa coorte di pazienti sono le seguenti: Lys357Glu [K357E], Arg104Trp [R104W] (3 pazienti affetti consanguinei), Ala283Val [A283V] (2 pazienti affetti consanguinei), Ser249Cys [S249C], Arg94Gln [R94Q], Arg280His [R280H] (2 pazienti affetti non consanguinei). Esse risultano principalmente localizzate nel dominio GTPasico della proteina (Fig 11). Tutti i pazienti, previo consenso informato, sono stati sottoposti a biopsia cutanea dalla quale sono stati ottenuti fibroblasti paziente specifici.

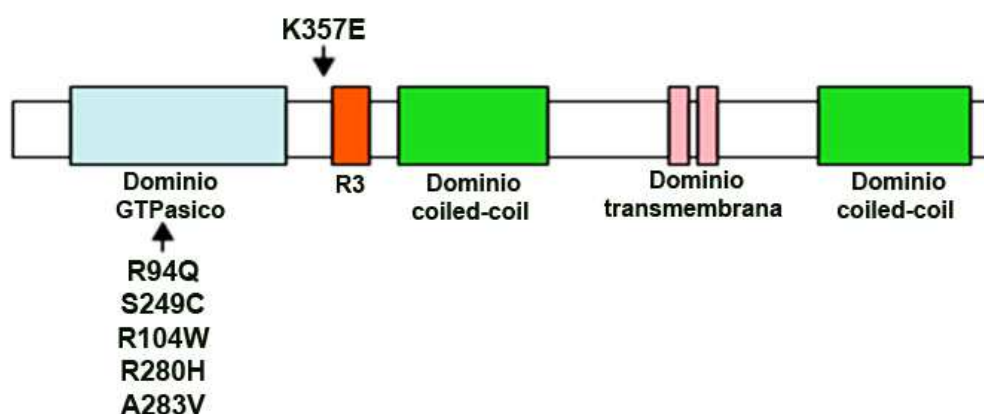


Figura 11. Rappresentazione schematica della proteina MFN2.

Rappresentazione schematica della proteina MFN2 con i suoi domini funzionali: dominio GTPasico (azzurro), dominio coiled-coil (verde), dominio transmembrana (rosa) e dominio R3 (arancio). Le mutazioni identificate nella nostra coorte di pazienti sono riportate in relazione alla loro localizzazione nella struttura proteica.

In questo studio, abbiamo utilizzato fibroblasti di un paziente CMT2A con mutazione A283V e, come controllo, fibroblasti ottenuti da un volontario sano.

4.2 Produzione virale e caratterizzazione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC)

Abbiamo generato cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), libere da vettori e sequenze transgeniche, partendo da fibroblasti primari di un paziente CMT2A (A283V), usando un metodo virale non integrante (Fig 12 a) [131,132, 210].

I fibroblasti cutanei sono stati infettati con quattro vettori “Sendai Virus”, ciascuno in grado di esprimere uno dei quattro fattori sufficienti per un’efficiente riprogrammazione (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) [131,132,210]. Il Sendai virus, a differenza di altri vettori virali che si integrano nel genoma della cellula ospite, restano a livello citosolico senza integrarsi, ma presentano un’efficienza di trasduzione e di espressione del transgene paragonabile a quella dei altri vettori virali integranti [131,132,210].

Le colonie ottenute sono state espanse inizialmente su piastre di MEF e solo successivamente trasferite su piastre rivestite con matrigel, in terreno per cellule staminali umane (mTeSR). Sono stati selezionati tre cloni utilizzati per gli esperimenti successivi.

Le colonie di iPSC possedevano una morfologia tipica delle ESC umane con un elevato rapporto nucleo-citoplasma e nucleoli prominenti ed esprimevano i tipici marcatori di pluripotenenza (Fig 12b). Le cellule iPS così generate mostravano un cariotipo normale ed erano in grado di differenziarsi nei derivati dei tre foglietti embrionali *in vitro* e di formare teratomi *in vivo*. Il DNA fingerprinting ha confermato la loro origine dai fibroblasti cutanei.

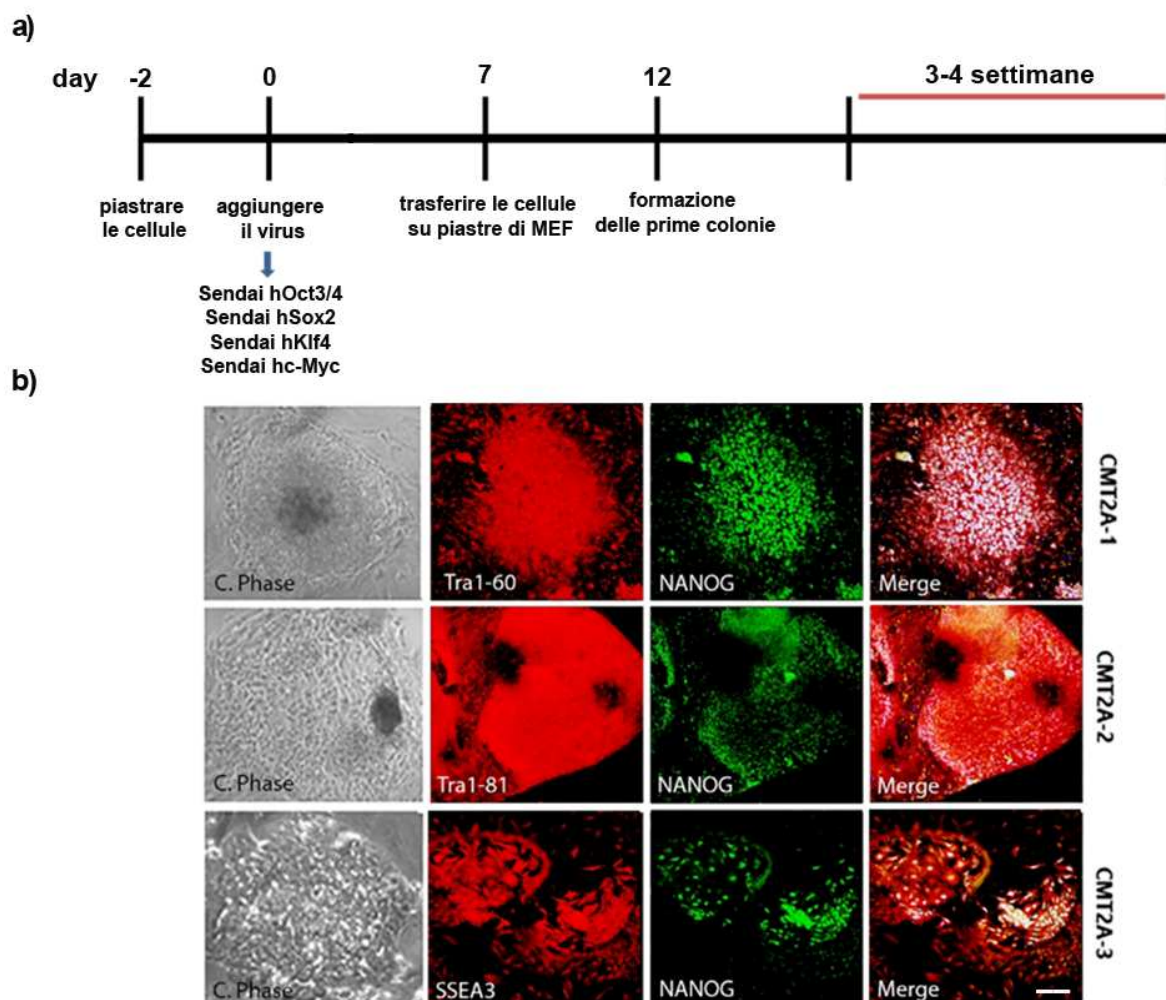


Figura 12. Generazione di una linea di iPSC CMT2A con metodo virale non integrante. Rappresentazione schematica del protocollo di riprogrammazione virale dei fibroblasti (a). I cloni iPSC CMT2A (CMT2A-1, CMT2A-2, CMT2A-3) possiedono una morfologia tipica delle ES ed esprimono i fattori trascrizionali come Nanog e i marker di superficie come SSEA3, TRA1-60, TRA1-81 (b). Scale bar: 100 μ m.

4.3 Generazione di motoneuroni da iPSC CMT2A e WT e loro caratterizzazione

Dato che l'isolamento dei motoneuroni (MN) direttamente da tessuti umani è difficilmente perseguibile, le iPSC rappresentano una sorgente alternativa promettente per lo studio dei MN paziente specifici.

Abbiamo generato MN da iPSC-CMT2A (derivate da fibroblasti del paziente CMT2A, A283V) e da iPSC-WT (derivate dai fibroblasti di un volontario sano). Per ottenere il differenziamento in senso motoneuronale, abbiamo ottimizzato un protocollo già descritto dal nostro gruppo [136] (Fig 13a).

Inizialmente, il fenotipo neuronale delle iPSC è stato indotto coltivandole in terreno neuronale. In questo modo, le iPSC si sono differenziate in cellule positive per la nestina, esprimendo il fenotipo tipico di cellule staminali neuronali. Dopo qualche giorno, si sono formate le rosette neuronali e al giorno 10 abbiamo aggiunto RA al terreno di coltura. Le cellule così ottenute co-esprimevano PAX6, altro marcatore neuroectodermico specifico. Dopo 15 giorni, le rosette neuronali sono state prelevate e trasferite su piastre trattate con laminina in terreno contenente RA, importante per la caudalizzazione, Shh, morfogeno centralizzante, e neurotrofine. La maggior parte di queste cellule sono risultate positive per la β -Tubulina IIIb (TuJ1) e, dopo un differenziamento ulteriore, anche per MAP2. Per promuovere il differenziamento completo in MN, abbiamo aggiunto nel terreno di coltura fattori neurotrofici, diminuendo la quantità di RA e Shh. Dopo 4-5 settimane di cultura, le cellule erano positive anche per il marcatore motoneuronale SMI-32 ed esprimevano anche la colina acetiltransferasi (ChAT), mostrando così un fenotipo di MN maturi (Fig 13b). All'esame microscopico queste cellule presentavano la morfologia tipica dei MN: erano grandi cellule, multipolari con processi dendritici e lunghi assoni. Dopo 8 settimane di coltura, il numero e la dimensione dei MN-CMT2A erano simili ai MN-WT. Non abbiamo osservato differenze significative nella sopravvivenza e nella lunghezza assonale tra MN-CMT2A e WT (Fig 13 c,d).

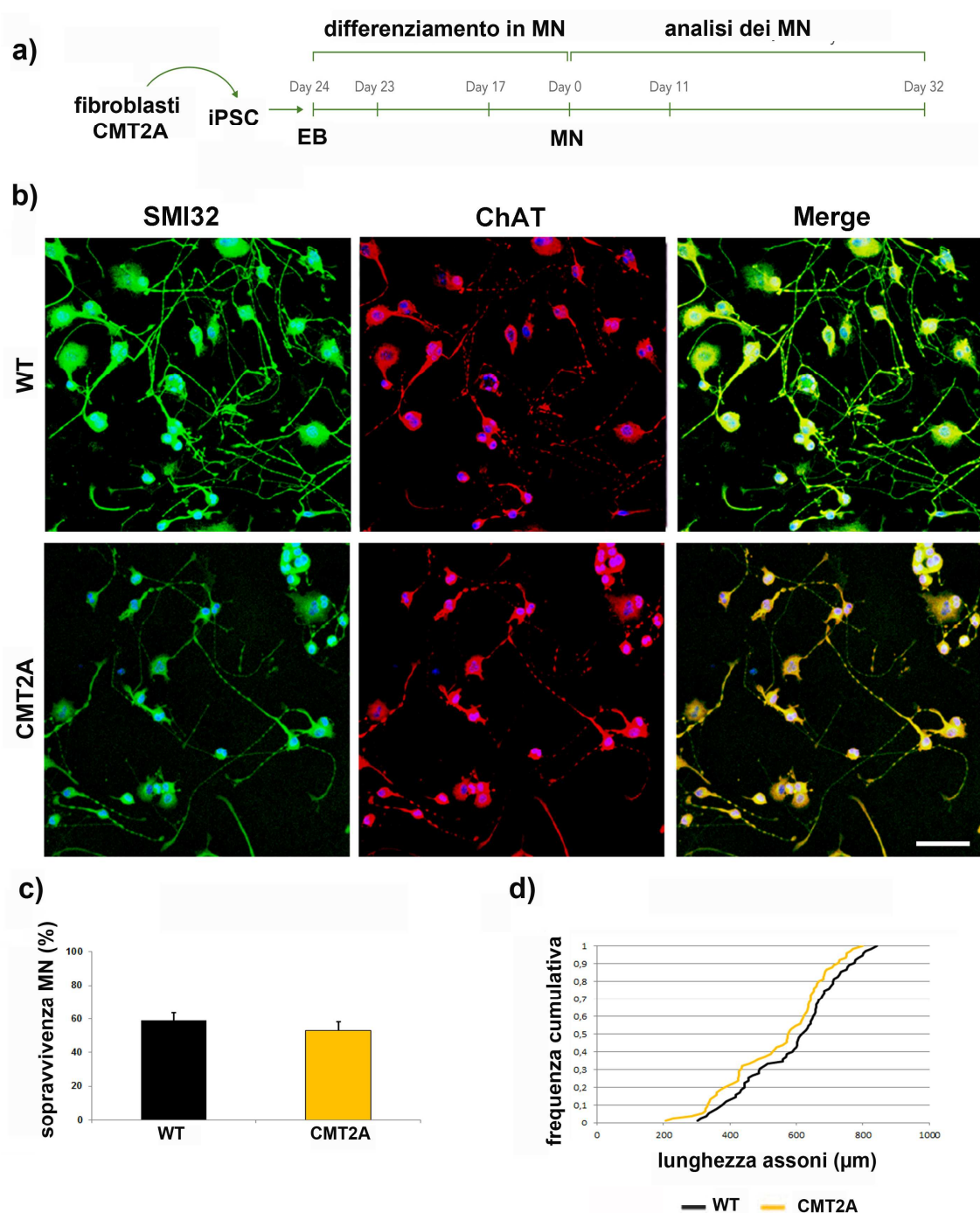


Figura 13. Differenziamento di iPSC-WT e CMT2A in MN.

Schema di differenziamento delle iPSC in MN (a). Le iPSC-WT e CMT2A differenziano in MN. Dopo 5 settimane, i MN sono positivi per SMI32 (verde) e ChAT (rosso). I MN positivi a SMI32/ChAT sono mostrati in giallo (merge). I nuclei sono marcati con DAPI (blue) (b). Analisi morfometriche dei MN a 8 settimane: conta motoneuronale espressa in % di MN rispetto alle cellule totali (c) e misura della lunghezza assonale (d). Scale bar: 100 μm.

4.4 Analisi del network mitocondriale nei fibroblasti e nei MN CMT2A

Negli ultimi anni, come dimostrato dai lavori presenti in letteratura, è diventato sempre più evidente che la regolazione del network mitocondriale, a cui la proteina MFN2 partecipa attivamente, è di vitale importanza per la sopravvivenza di cellule, soprattutto ad alta richiesta energetica come i neuroni [26,46]. Dati presenti in letteratura su fibroblasti di pazienti mostrano risultati discordanti circa l'effetto delle mutazioni della MFN2 sul trasporto mitocondriale, sull'integrità del DNA mitocondriale (mtDNA) e sulla funzionalità degli enzimi della catena respiratoria [27,46].

Il nostro scopo è stato quello di studiare questi parametri non solo nei fibroblasti del nostro paziente, ma anche nei MN, direttamente coinvolti nella CMT2A, per valutare l'eventuale specificità neuronale della patologia e contribuire a definire i meccanismi molecolari responsabili della patologia. In parallelo, queste analisi ci hanno permesso di identificare eventuali biomarcatori della condizione patologica utili per valutare l'efficacia di nuove strategie terapeutiche.

4.4.1 Analisi della localizzazione e della quantità dei mitocondri

Differenti gruppi hanno mostrato che neuroni di ratti difettivi per la MFN2 presentano anomalie nel trasporto mitocondriale: i mitocondri si localizzano principalmente intorno al nucleo, risultando assenti nelle porzioni più periferiche della cellula [26,49]. Alterazioni analoghe nel movimento mitocondriale sono state osservate anche in fibroblasti embrionali murini difettivi per MFN2 [33].

Per valutare questo parametro, abbiamo analizzato la localizzazione mitocondriale nei fibroblasti e nei MN CMT2A rispetto ai WT, marcando i mitocondri con Mitotracker-Red (Fig 14). Sia nei fibroblasti che nei MN del paziente, a differenza del controllo, i mitocondri presentano una localizzazione disomogenea all'interno della struttura cellulare. Si concentrano in cluster intorno al nucleo e sono praticamente assenti nelle porzioni più periferiche della cellula.

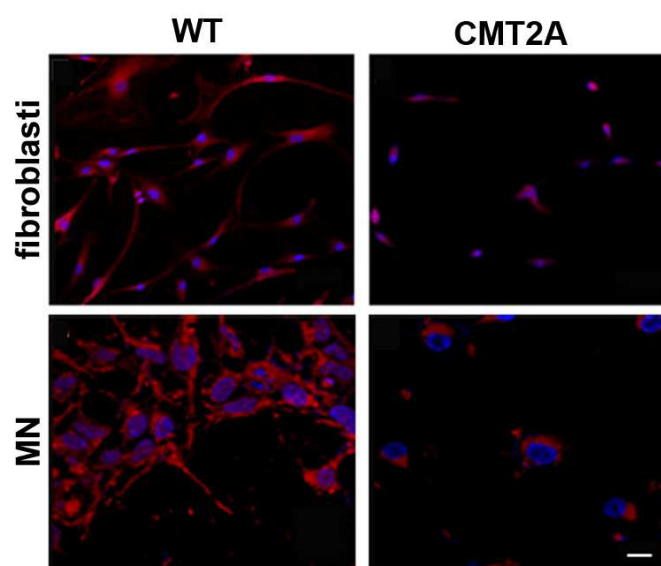


Figura 14. Localizzazione dei mitocondri in cellule WT e CMT2A.

Analisi della localizzazione dei mitocondri nei fibroblasti e MN WT e CMT2A.

I mitocondri sono stati marcati in rosso (Mitotracker Red). I nuclei sono stati marcati con DAPI. Scale bar: 100 μ m.

L'alterazione della localizzazione dei mitocondri all'interno della cellula può dipendere solo da anomalie nel trasporto o anche da una riduzione del numero complessivo di mitocondri. Per avere una stima del numero totale di mitocondri, abbiamo quantificato mediante western blot i livelli di espressione della proteina mitocondriale PORINA nei fibroblasti e MN CMT2A rispetto ai WT (Fig 15). Le analisi hanno mostrato una notevole riduzione (80%) dei livelli di espressione della PORINA nei MN CMT2A rispetto ai WT. Nessuna differenza è stata osservata tra i fibroblasti CMT2A e WT (Fig 15).

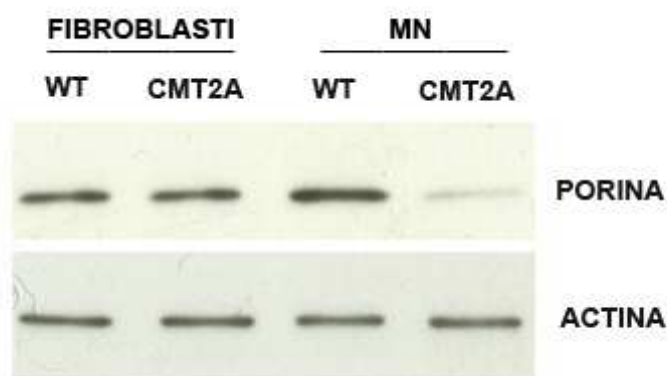


Figura 15. Espressione della PORINA nelle cellule WT e CMT2A.

Analisi di western blot per la proteina PORINA in fibroblasti e MN CMT2A rispetto ai WT.

L'actina è stata impiegata per scopi di normalizzazione.

4.4.2 Analisi del potenziale di membrana

Nei fibroblasti e nei MN CMT2A, abbiamo valutato l'eventuale presenza di alterazioni del potenziale di membrana mitocondriale mediante un saggio basato sull'utilizzo di una sonda con due diversi tipi di emissione in relazione al potenziale di membrana mitocondriale (JC-1, Sigma Aldrich).

Il 5,5',6,6'-tetracloro-1-1',3,3'-tetraetilbenzimidazoloicarbaniene (JC-1) è un monomero che emette fluorescenza verde in presenza di un basso potenziale di membrana. A potenziali alti, i monomeri di JC-1 si aggregano sottoforma di spot a fluorescenza rossa. La differente fluorescenza dipende solo dal potenziale di membrana mitocondriale e non è influenzata da nessun altro parametro tra cui dimensione, forma o densità dei mitocondri. Le analisi condotte sui fibroblasti e sui MN CMT2A non hanno rilevato nessuna differenza nel potenziale di membrana rispetto alle cellule WT (Fig 16).

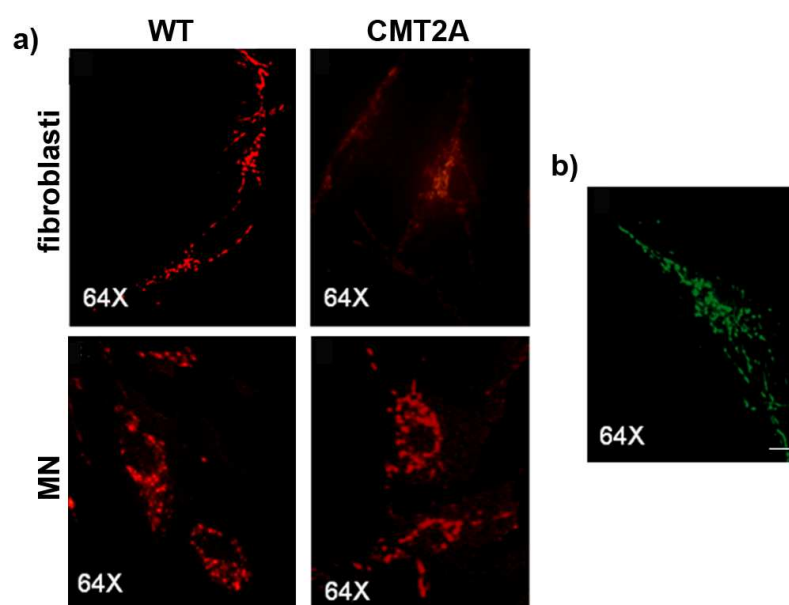


Figura 16. Analisi del potenziale di membrana mitocondriale nelle cellule WT e CMT2A.

Staining con JC1 dei fibroblasti e dei MN WT e CMT2A (a). Come controllo positivo, i fibroblasti WT sono stati trattati con Valinomicina (b). La fluorescenza verde indica alterazioni del potenziale di membrana mitocondriale; la fluorescenza rossa indica il mantenimento di un corretto potenziale di membrana.

4.4.3 Analisi del DNA mitocondriale (mtDNA)

Un numero sempre più crescente di sindromi cliniche è associato con alterazioni del numero di copie del mtDNA e della sua integrità. I dati mostrati in letteratura nei modelli animali e cellulari con anomalie nel gene *MFN2* risultano discordanti circa l'effetto che tali mutazioni potrebbero avere sul mtDNA e sulla sua stabilità [27,46].

Per chiarire questo aspetto, abbiamo analizzato la quantità di mtDNA nei fibroblasti e nei MN CMT2A e WT, mediante un saggio di real time PCR (RT-PCR) con primer specifici per il gene mitocondriale umano *CYTB* e per il gene nucleare *APP*. Le analisi hanno mostrato una riduzione della quantità di mtDNA nei MN CMT2A rispetto ai WT, così come nelle iPSC

indifferenziate. Le stesse analisi condotte sui fibroblasti non hanno rilevato nessuna differenza tra il paziente e il controllo (Fig 17).

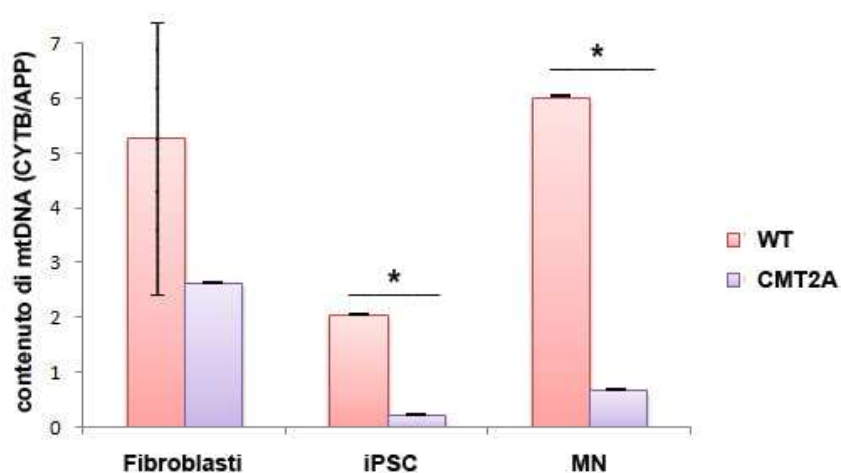


Figura 17. Quantificazione del mtDNA nelle cellule WT e CMT2A.

Analisi del contenuto di mtDNA nei fibroblasti, nelle iPSC e nei MN CMT2A rispetto ai WT, mediante un saggio di RT-PCR con primer specifici per il gene mitocondriale CYTB e per il gene nucleare APP. Differenze statisticamente significative sono indicate * $P < 0.05$.

Per valutare l'integrità del mtDNA, sugli stessi campioni è stato allestito un saggio di RT-PCR, quantificando l'ammontare di molecole di mtDNA non delete (ND4) rispetto al numero totale di molecole (ND1). L'analisi hanno confermato l'assenza di delezioni o riarrangiamenti a livello del mtDNA nelle cellule CMT2A (Fig 18). In parallelo, l'integrità del mtDNA è stata valutata mediante un saggio di Long Range PCR, confermando l'assenza di delezioni (dati non mostrati).

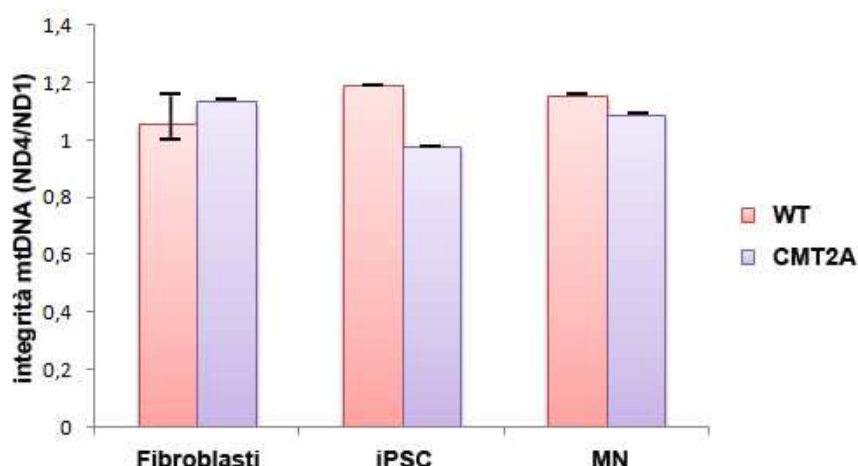


Figura 18. Analisi dell'integrità del mtDNA nelle cellule WT e CMT2A.

Analisi dell'integrità del mtDNA nei fibroblasti, nelle iPSC e nei MN CMT2A rispetto ai WT, mediante un saggio di RT-PCR che quantifica il numero di molecole di mtDNA non delete (ND4) rispetto alle molecole totali (ND1) presenti.

4.4.4 Studi biochimici dei complessi della catena respiratoria

La relazione tra mutazioni nel gene *MFN2* e un malfunzionamento della catena respiratoria non è ancora del tutto definita e i dati presenti in letteratura sono discordanti. Modelli animali di CMT2A mostrano un difetto di attività del complesso II e IV nei neuroni [71], mentre studi condotti in fibroblasti di pazienti CMT2A non mostrano nessuna alterazioni di attività di questi complessi [46] o solo difetti minimi [45]. Un lavoro più recente ha invece mostrato, nei fibroblasti CMT2A, disfunzioni della catena respiratoria in associazione ad alterazioni del numero di copie del mtDNA e alla presenza di delezioni del mtDNA [27].

Abbiamo dosato l'attività dei complessi della catena respiratoria nei fibroblasti e MN CMT2A e WT. Tutti i dati ottenuti sono stati normalizzati all'attività della citrato sintetasi (CS) (Tab 4). Dalle analisi biochimiche, si osserva una riduzione di attività del complesso II nei fibroblasti e nei MN CMT2A rispetto ai WT, rispettivamente del 55% e del 58%. Anche l'attività

della succinato deidrogenasi (Succ DH) risulta ridotta del 43% nelle cellule CMT2A rispetto ai WT (Tab. 4).

	NADH DH	SDH	Complesso II	Complesso I+ III	Complesso II+ III	Complesso IV
Fibroblasti WT	2534,7	11,54	16,63	251,88	8,22	46,20
Fibroblasti CMT2A	2332,3	6,68	7,46	280,35	5,59	45,93
MN-WT	702,9	14,38	25,28	42,64	6,86	15,82
MN-CMT2A	754,9	8,32	10,30	43,26	2,98	15,70

Tabella 4. Analisi biochimica dell'attività dei complessi della catena respiratoria nelle cellule WT e CMT2A.

L'attività enzimatica (ng min/mg) di ciascun enzima è stata normalizzata all'attività della citrato sintetasi (CS). NADH DH, NADH Deidrogenasi; SDH, Succinato deidrogenasi.

4.5 Analisi del fenotipo mitocondriale nel modello murino di CMT2A

In parallelo ai modelli cellulari, la possibilità di studiare anche modelli animali di una patologia è sicuramente utile per aumentare le conoscenze circa i meccanismi patogenetici, ma anche per identificare validi marcatori del fenotipo patologico, la cui reversione può essere utilizzata per valutare l'efficienza di strategie terapeutiche. Attualmente, l'unico modello animale di CMT2A disponibile è quello descritto dal gruppo di Cartoni (MitoCharc1) [70], ma molti aspetti della sua caratterizzazione non sono ancora del tutto definiti e in alcuni casi abbastanza controversi. Il modello murino MitoCharc1 esprime a livello del sistema nervoso la forma mutata R94Q della proteina MFN2 e mostra i tipici sintomi della CMT2A. In modo particolare, gli autori hanno osservato la comparsa di difficoltà motorie e una variazione della dimensione degli assoni mielinizzati correlata ad un

incremento del numero dei mitocondri in questi assoni a partire dai 5 mesi di età del modello murino [70].

In questo studio, abbiamo ampliato la caratterizzazione di questo modello murino, principalmente in termini di disfunzioni mitocondriali, con approcci simili a quelli utilizzati *in vitro*, al fine di definire i biomarcatori del fenotipo patologico da sfruttare per valutare l'eventuale efficacia di strategie terapeutiche.

Nel nostro studio, i topi (B6;D2-Tg(Eno2-MFN2*R94Q)L51Ugfm/J) sono stati ottenuti dal laboratorio della Jackson. A differenza di quanto descritto nel lavoro di Cartoni, dal punto di vista della funzionalità motoria, valutata mediante rotarod test, non sono state osservate differenze significative tra i topi MitoCharc1 e i topi controllo (Non-Tg) di diverse età (1, 3, 5 e 12 mesi). Nessuna mortalità precoce è stata inoltre evidenziata.

L'esame istologico condotto sul tessuto muscolare dei topi MitoCharc1 non ha evidenziato alterazioni nel numero di fibre positive per la citocromo c ossidasi (COX) né variazioni nello staining per la succinato deidrogenasi (SDH) rispetto ai topi controllo (Non-Tg) (Fig 19).

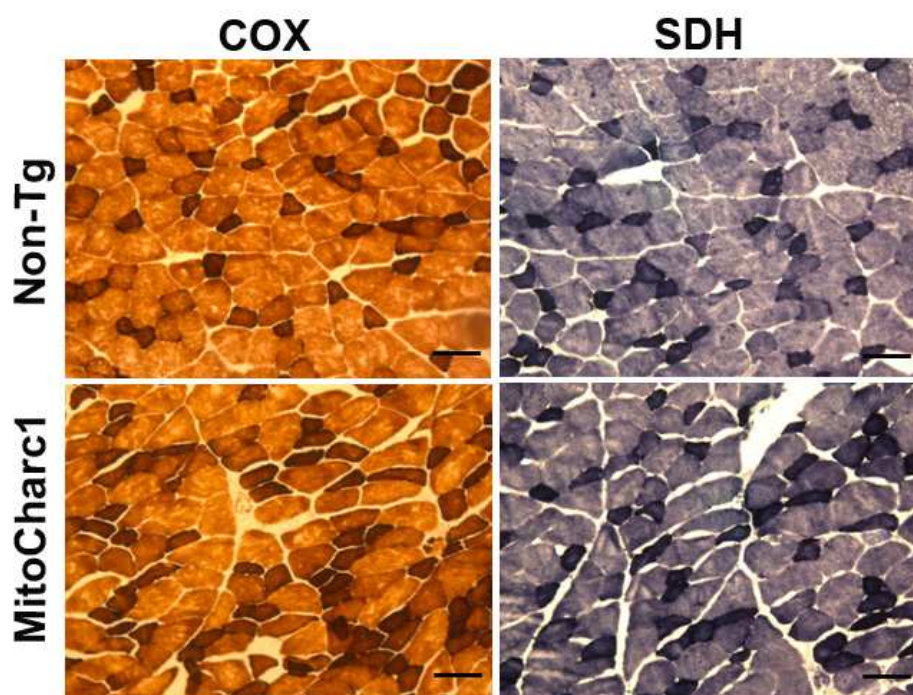


Figura 19. Analisi istochimica del muscolo vasto nei topi MitoCharc1 e nei controlli.

Istochimica per la Citocromo C Ossidasi (COX) e per la Succinato Deidrogenasi (SDH) nel muscolo del topo MitoCharc1 e del controllo (Non-Tg) a 8 mesi di età. Scale bars: 25 μ m.

Nei pazienti CMT2A è stato osservato un incremento del numero di mitocondri nella porzione distale degli assoni del nervo sciatico [4,218,219]. Questo incremento non è sempre stato osservato nei modelli *in vitro* e *in vivo* della patologia [25,26]. Il gruppo di Cartoni ha osservato, mediante microscopia elettronica, un aumento del numero dei mitocondri negli assoni di medio e piccolo diametro del nervo sciatico di topi MitoCharc1 rispetto ai controlli, creando quindi una correlazione tra anomalie mitocondriali e difetti motori [70].

Alla luce di questi dati, abbiamo investigato questo aspetto nel modello murino di CMT2A a nostra disposizione.

Abbiamo inizialmente valutato il numero di mitocondri negli assoni del nervo sciatico di topi MitoCharc1 e controlli (Non-Tg) di 8 mesi di età mediante microscopia elettronica (Fig 20). La conta dei mitocondri è stata

condotta separatamente per le fibre di diametro minore e maggiore di 3,5 μm . Nei topi MitoCharc1, le analisi hanno mostrato in entrambi i tipi di fibre una riduzione del numero di mitocondri per assone, rispetto ai controlli (24% nelle fibre <3,5 μm e 33% nelle fibre >3,5 μm ; Fig 20 a,b).

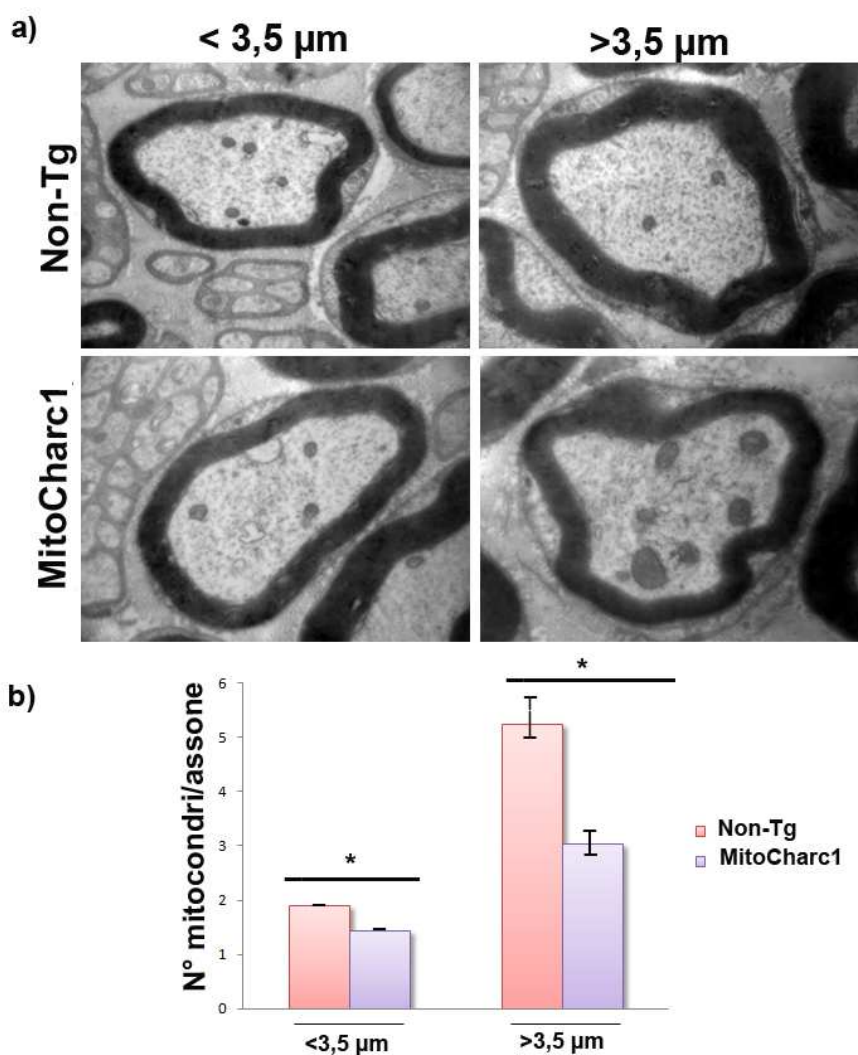


Figura 20. Analisi del numero di mitocondri nella porzione distale del nervo sciatico di topi MitoCharc1 e controlli.

Il contenuto assonale di mitocondri è stato quantificato mediante analisi di microscopia elettronica delle sezioni distali di nervo sciatico di topi MitoCharc1 (n=5) e controlli (Non-Tg; n=3) di 8 mesi di età (a). Quantificazione del numero relativo di mitocondri per assone in topi MitoCharc1 e Non-Tg (b). In particolare, il contenuto di mitocondri è stato valutato separatamente negli assoni con diametro minore o maggiore di 3,5 μm . Differenze statisticamente significative sono indicate *P<0.05.

Per investigare la relazione tra le variazioni del numero di mitocondri negli assoni e i difetti motori, abbiamo analizzato la morfologia degli assoni nel nervo sciatico di topi MitoCharc1 e dei controlli (Non-Tg). Nessun segno di degenerazione assonale è stato osservato (Fig 21). Anche in termini di densità delle fibre mieliniche non sono state osservate differenze significative tra i topi MitoCharc1 e i controlli (densità di fibre mieliniche/mm²: 23097 e 21157, rispettivamente).

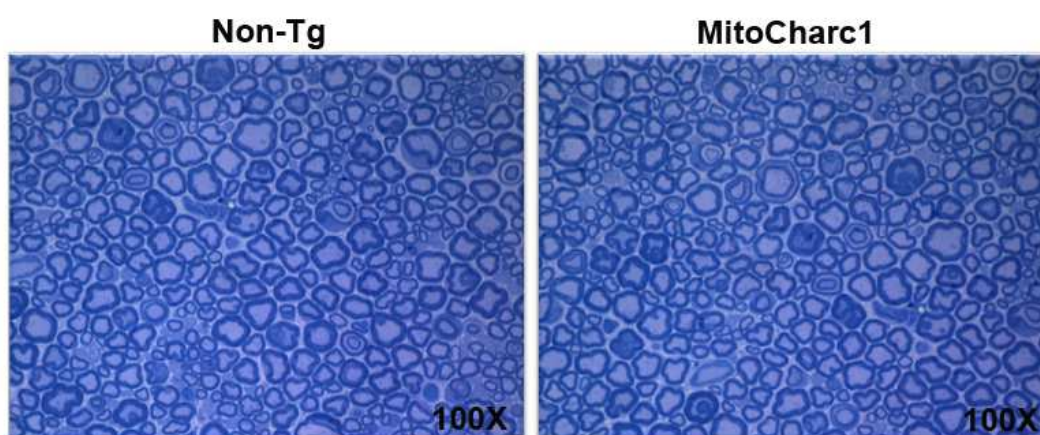


Figura 21. Analisi morfologiche a livello del nervo sciatico di topi MitoCharc1 e controlli.

Sezioni semi-fini di nervo sciatico di topi MitoCharc1 e controlli (Non-Tg) di 8 mesi di età colorati con il blu di toluidine.

I dati relativi al numero di mitocondri sono in disaccordo rispetto a quanto mostrato nel lavoro di Cartoni, dove nel modello di CMT2A si osserva un aumento del numero di mitocondri nelle fibre di diametro inferiore ai 3,5 μm rispetto ai controlli [70].

Proprio sulla base di queste apparenti incongruenze, abbiamo approfondito questo aspetto attraverso diverse metodiche, come l'analisi del mtDNA e il dosaggio dell'attività della citrato sintetasi, analisi che possono comunque fornire una stima del numero di mitocondri al fine di definire un reale biomarcatore del fenotipo patologico.

La quantificazione del mtDNA in diversi tessuti murini (cervello, midollo spinale, muscolo e nervo sciatico) del topo MitoCharc1 non ha mostrato alcuna differenza significativa rispetto ai topi controllo (Fig 22)

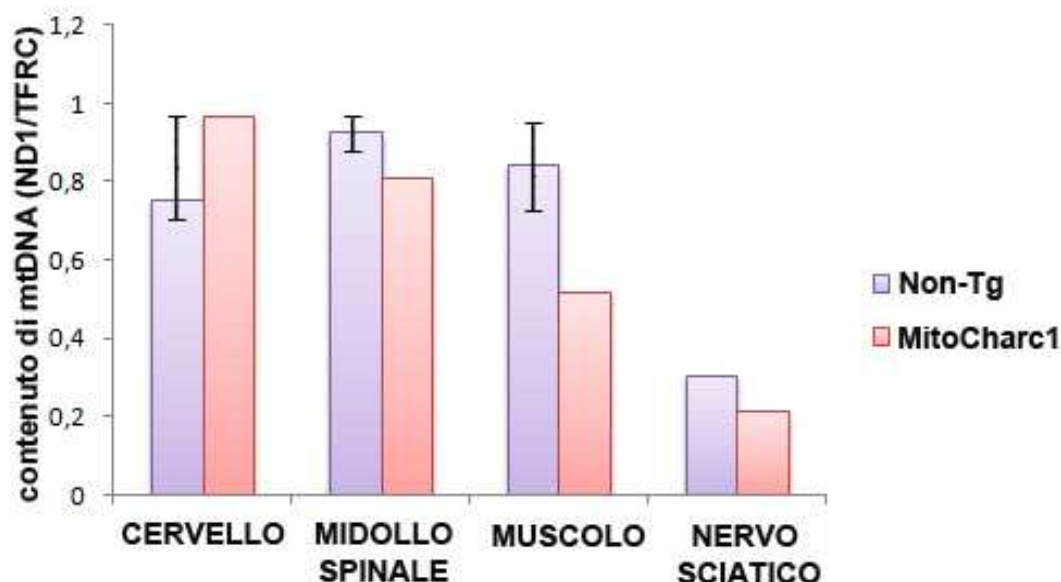


Figura 22. Quantificazione del mtDNA nei tessuti del modello murino MitoCharc1 e nei controlli.

Analisi del contenuto di mtDNA nel cervello, midollo spinale, muscolo e nervo sciatico del modello murino MitoCharc1 e del controllo (Non-Tg), mediante RT-PCR con primer specifici per il gene mitocondriale *ND1* e per il gene nucleare *TRFC*.

In parallelo sugli stessi animali, abbiamo registrato l'attività della citrato sintetasi (CS) a livello del nervo sciatico di topi MitoCharc1 e controlli (Non-Tg) di 8 mesi di età (n=3 per gruppo) (Tab 5). L'attività della CS, enzima normalmente utilizzato come normalizzatore negli studi biochimici, potrebbe fornire una stima del numero totale di mitocondri. Non si osservano variazioni significative nell'attività di questo enzima tra i topi CMT2A e i topi controllo (Tab 5).

	CS	NADH DH
Non-Tg	76,915	526,2
MitoCharc1	76,636	454,26

Tabella 5. Analisi biochimica dell'attività della citrato sintetasi a livello del nervo sciatico di topi Mitocharc1 e controlli.

L'attività enzimatica (ng min/mg) della citrato sintetasi (CS) è stata misurata a livello del nervo sciatico di topi Mitocharc1 e controlli (Non-Tg) di 8 mesi di età. L'attività delle CS è stata normalizzata all'attività della NADH Deidrogenasi (NADH DH).

I dati relativi alla quantificazione del mtDNA e all'attività della citrato sintetasi mostrano l'assenza di variazioni della quantità totale di mitocondri a livello del nervo sciatico dei topi Mitocharc1 rispetto ai controlli. Questo dato è stato ulteriormente confermato dalle analisi di western blot relative ai livelli di espressione della proteina mitocondriale PORINA (Fig 23). Non si osservano differenze nei livelli di espressione di questa proteina a livello del nervo sciatico, confermando l'assenza di variazioni del numero totale di mitocondri.

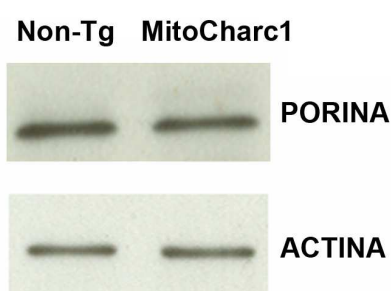


Figura 23. Espressione della proteina PORINA nel nervo sciatico dei topi MitoCharc1 e dei controlli.

Analisi di western blot per la proteina PORINA su nervo sciatico di topi MitoCharc1 e controlli (Non-Tg) a 8 mesi di età (n=3). L'actina è stata impiegata per scopi di normalizzazione.

Sulla base dei dati attualmente disponibili, non è stato possibile definire dei biomarcatori del fenotipo patologico nel modello murino di CMT2A.

4.6 Terapia genica per la CMT2A

Per sviluppare una possibile terapia genica per la CMT2A, abbiamo utilizzato un approccio di RNA interfering (RNAi). Questa strategia si basa sul silenziamento del gene *MFN2* (allele wild-type e mutato) mediante una sequenza di short hairpin RNA (shRNA). I livelli di espressione della proteina MFN2 wild-type vengono ristabiliti mediante la trasfezione del c-DNA del gene *MFN2*, opportunamente modificato per resistere al processo di silenziamento mediato da shRNA.

4.6.1 Generazione dei vettori anti-MFN2 shRNA and MFN2R

Per il silenziamento del gene *MFN2*, sono state identificate le due migliori sequenze target a livello del gene *MFN2*:

Target 1: 5'-**CCTCAAGGTTTATAAGAAT**-3'

Target 2: 5'-**GCAAAGCTGCTCAGGAATA**-3'

Partendo da queste sequenze, sono state sintetizzate le due sequenze di anti-MFN2 shRNA, complementari rispettivamente al target1 (shRNA_{tg1}) e al target2 (shRNA_{tg2}), successivamente clonate nel vettore pSuper.puro per la loro espressione in cellule di mammifero:

shRNA_{tg1}: **GGAGTTCCAAATATTCTTA**

shRNA_{tg2}: **CGTTTCGACGAGTCCTTAT**

In parallelo, abbiamo modificato il c-DNA del gene *MFN2*, clonato nel plasmide pCMV6-Entry, in modo da essere resistente al silenziamento mediato da shRNA_{tg1} (MFN2R_{tg1}; Fig 24a) o da shRNA_{tg2} (MFN2R_{tg2}; Fig 24b). La sequenza nucleotidica è stata modificata inserendo delle mutazioni silenti (sostituzioni nucleotidiche in terza posizione di alcune triplette), mediante mutagenesi sito specifica, in modo da impedire la complementarità di sequenza con lo shRNA, senza modificarne però la

sequenza amminoacidica codificata. L'effettiva presenza delle mutazioni è stata verificata mediante sequenziamento diretto (Big Dye terminator 3.1 on ABI 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) (Fig 24).

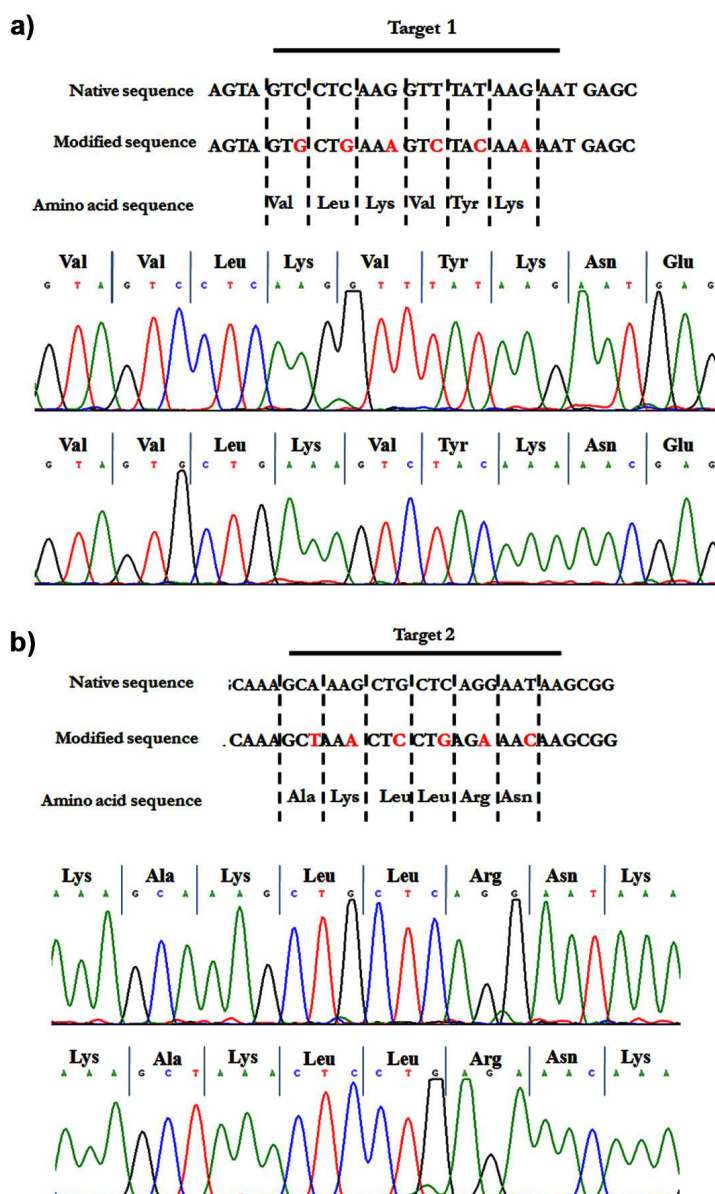


Figura 24. Sintesi del costrutto MFN2R.

Schema della mutagenesi multi-sito a livello di due regioni, target 1 (a) e target 2 (b), del c-DNA del gene *MFN2*. I nucleotidi mutati rispetto alle sequenze wild-type sono riportati in rosso. Sono mostrate le analisi di sequenziamento del gene *MFN2* dopo il processo di mutagenesi (a,b).

4.6.2 Validazione della terapia genica *in vitro*

Per verificare l'efficacia della nostra strategia di RNAi, le cellule HeLa sono state cotrasfettate con i vettori shRNA_{tg1}/MFN2R_{tg1} o shRNA_{tg2}/MFN2R_{tg2} in rapporto di 1:1 o di 1:3. Come controllo, nelle stesse condizioni, le cellule sono state trasfettate con il vettore pSUPuro-SCR contenete una sequenza scrambled (SCR). Le cellule sono state raccolte a 72 ore dalla trasfezione per le analisi di western blot (Fig 25).

Le analisi di western blot hanno mostrato una riduzione dei livelli endogeni della proteina MFN2 e una overespressione dei livelli esogeni di MFN2. I risultati sono più marcati in presenza dei costrutti shRNA_{tg2}/MFN2R_{tg2} (Fig 25).

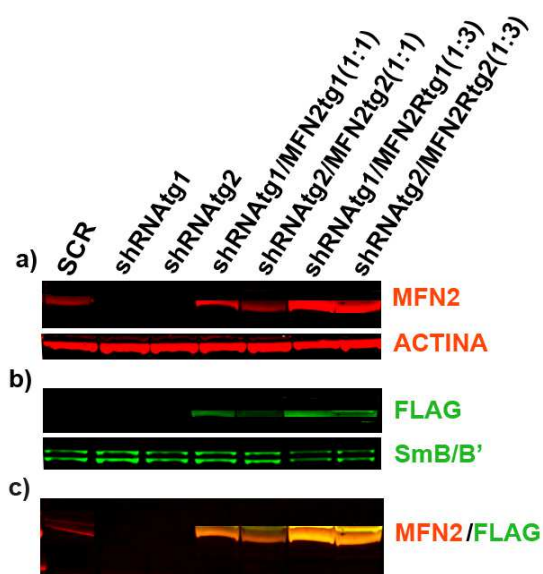


Figura 25. Espressione della MFN2 in cellule HeLa trasfettate con i costrutti shRNA/MFN2R.

Analisi di western blot per la proteina MFN2 in HeLa a 72 ore dalla trasfezione con shRNA_{tg1}, shRNA_{tg2}, shRNA_{tg1}/MFN2R_{tg1} o shRNA_{tg2}/MFN2R_{tg2}. Come controllo, le cellule HeLa sono state trasfettate con la sequenza scramble (SCR). In rosso, l'espressione totale della proteina MFN2 valutata con l'anticorpo α -MFN2 (a). In verde l'espressione della proteina MFN2 esogena valutata con un anticorpo α -FLAG (b). in giallo la sovrapposizione dei due segnali (c). L'actina e SmB/B' sono stati impiegati per scopi di normalizzazione.

Questi esperimenti ci hanno permesso di definire i costrutti shRNA_{tg2}/MFN2R come i migliori in termini di efficienza di silenziamento della proteina endogena e di overespressione dei livelli esogeni di MFN2. Per questa ragione nei successivi esperimenti *in vitro* sia *in vivo* abbiamo deciso di testare esclusivamente questa coppia di costrutti.

Abbiamo quindi testato questa strategia nei fibroblasti CMT2A (A283V), trasfettandoli con i vettori shRNA_{tg2}/MFN2R_{tg2}. A 72 ore dalla trasfezione, le analisi di western blot hanno mostrato un efficace silenziamento della proteina MFN2 endogena ed elevati livelli di espressione della proteina MFN2 esogena (Fig 26).

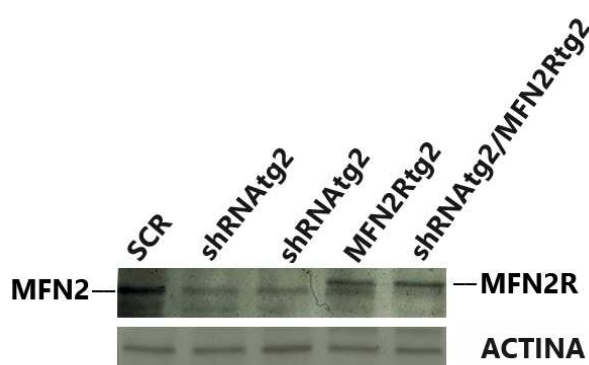


Figura 26. Espressione della MFN2 in fibroblasti CMT2A trasfettati con i costrutti shRNA/MFN2R.

Analisi di western blot per la proteina MFN2 in fibroblasti CMT2A a 72 ore dalla trasfezione con shRNA_{tg2}, MFN2R_{tg2} o shRNA_{tg2}/MFN2R_{tg2}. Come controllo, i fibroblasti stati trasfettati con la sequenza scramble (SCR). L'actina è stata impiegata per scopi di normalizzazione

Sono attualmente in corso esperimenti di trasfezione di questi vettori nelle iPSC e MN CMT2A in modo da poter valutare l'effetto terapeutico di questa strategia di RNAi, in termini di rescue del fenotipo, anche nel tipo cellulare affetto specificatamente nella patologia.

4.6.3 Produzione e purificazione dei vettori AAV9-shRNA_{tg2} e AAV9-MFN2R_{tg2}

Recentemente, il gruppo del Prof. Kaspar ha dimostrato che la terapia genica con vettori adeno associati 9 (AAV9), veicolanti gene difettivi nella patologia o costrutti silenzianti, in modelli animali di diverse malattie neurodegenerative come la SMA e la SLA, determina un miglioramento nel mantenimento della funzionalità motoria e della fisiologia neuromuscolare [203,205,209]. Nel nostro progetto abbiamo applicato un simile approccio di terapia genica per la CMT2A. Per il costrutto shRNA_{tg2}, abbiamo utilizzato il self complementary AAV9 (scAAV9); per il costrutto MFN2R_{tg2}, a causa della lunghezza del gene, abbiamo utilizzato il single strand AAV9 (ssAAV9).

In particolare per la produzione di AAV9 contenenti shRNA_{tg2} (AAV9-shRNA_{tg2}), MFN2R_{tg2} (AAV9-MFN2R_{tg2}) o GFP (AAV9-GFP) ci siamo appoggiati alla ditta Signagen Laboratories. Abbiamo inserito il costrutto d'interesse nelle particelle virali AAV9 utilizzando un protocollo di trasfezione tripla standard. Il plasmide AAV con il genoma virale ricombinante è stato trasfettato in cellule HEK293 insieme a plasmidi helper necessari per il packaging virale (pRep2Cap9, fornisce le proteine di replicazione e del capsido in trans; pHelper, fornisce al virus helper la funzione necessaria in trans). 72 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state raccolte e lisate. In seguito, il virus è stato purificato attraverso due fasi di purificazione con gradiente di densità del Cloruro di Cesio; dializzato contro PBS, formulato con 0,001% Pluronic-F68 per evitare l'aggregazione e conservato a 4 °C. Tutti i vettori sono stati titolati mediante PCR quantitativa utilizzando la tecnologia Taq-Man. La purezza dei vettori è stata valutata mediante SDS elettroforesi su gel d'acrilamide al 4-12% e colorazione d'argento. I vettori AAV9-CB-GFP sono stati preparati con lo stesso protocollo.

4.6.4 Validazione della terapia genica *in vivo*

Il nostro scopo è dimostrare che l'AAV9 può essere la terapia vettoriale genica appropriata per la CMT2A, testando la sua efficacia in modelli animali della patologia. Attualmente, nessuno studio ha mai descritto un approccio terapeutico genico di questo tipo per la CMT2A. Poiché il gruppo del Prof. Kaspar ha mostrato che iniezioni endovenose di AAV9, veicolanti geni difettivi nella patologia, in topi SMA di un giorno (P1) determinano l'infezione di circa il 60% dei MN e possono curare l'animale, abbiamo applicato lo stesso protocollo alla CMT2A, anche vista la somministrazione poco invasiva [203,205].

Prima di valutare l'efficacia terapeutica, abbiamo verificato l'efficienza dell'infezione nel sistema nervoso centrale dopo iniezione intravenosa utilizzando il virus reporter AAV9-GFP. Basandoci sulla concentrazione descritta nel lavoro di Kaspar [205], abbiamo iniettato 5×10^{11} unità di AAV9-GFP in topi CMT2A nella vena facciale a P1, e 10 giorni dopo l'iniezione abbiamo sacrificato i topi e analizzato il midollo spinale per verificare la presenza del segnale del gene reporter GFP (Fig 27a). Il virus raggiunge efficientemente il SNC dopo iniezione sistemica ed è in grado di trasdurre i MN presenti, come dimostrato dalla positività al marcatore motoneuronale SMI32 (Fig 27b,c).

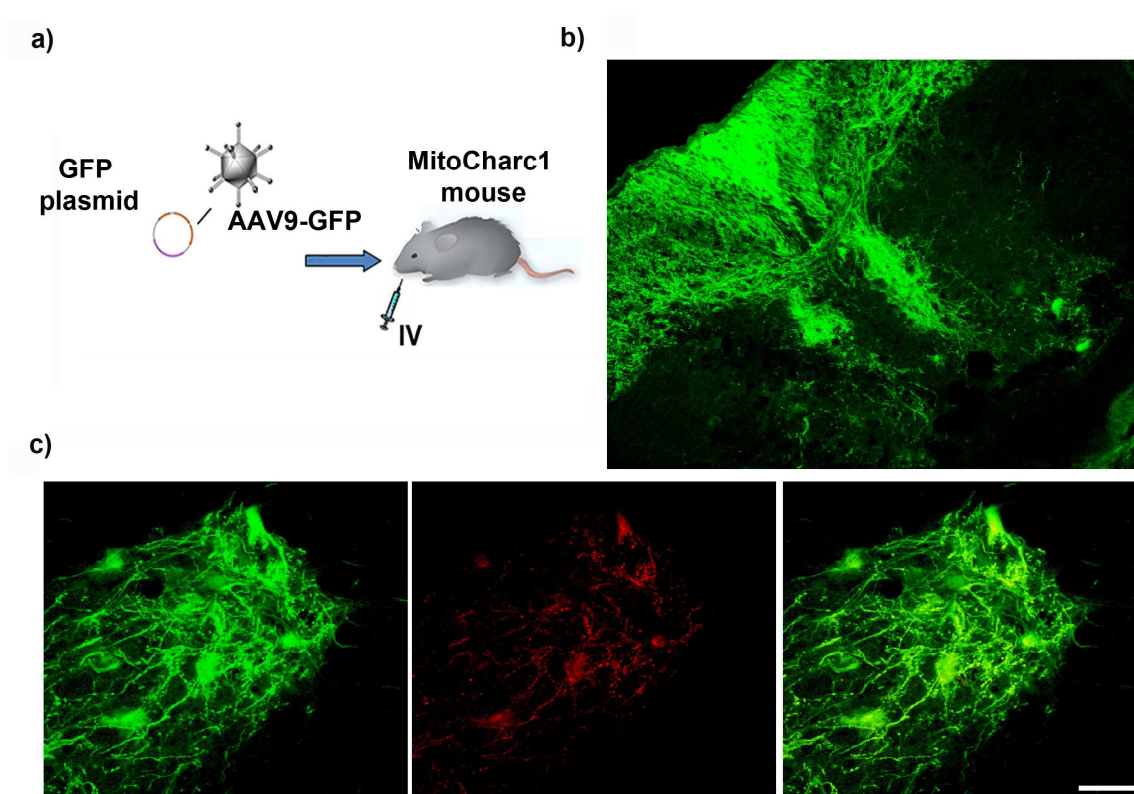


Figura 27. Efficienza di trasduzione del vettore AAV9-GFP nel midollo spinale del modello murino di CMT2A.

Protocollo di somministrazione sistemica (IV, intravena) del vettore AAV9-GFP nel modello murino di CMT2A (a). Immunoistochimica di sezioni di midollo spinale di topi CMT2A a 10 giorni dalla somministrazione sistemica del vettore AAV9-GFP (b). Le cellule trasdotte dal vettore AAV9-GFP (verdi) risultano positive anche al marcatore motoneuronale SMI-32 (rosso) (c). Scale bar: 100 μ m.

Per verificare l'efficienza dei nostri costrutti, abbiamo iniettato 10 μ l AAV9-shRNA_{tg2} e dell'AAV9-MFN2R_{tg2} nel muscolo gastrocnemio di topi adulti MitoCharc1 e abbiamo analizzato il livello proteico di MFN2 nel tessuto muscolare dopo 15 giorni dal trattamento. L'analisi di western blot ha mostrato una riduzione dei livelli della proteina MFN2 dopo il trattamento con AAV9-shRNA_{tg2} e un aumento della proteina MFN2 dopo trattamento con AAV9-MFN2R_{tg2} (Fig 28).

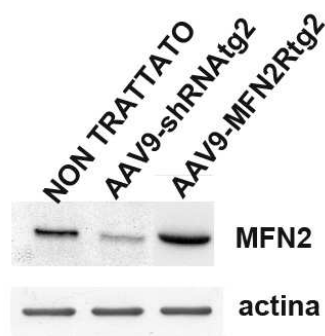


Figura 28. Espressione della proteina MFN2 nel muscolo gastrocnemio dopo trattamento con i vettori AAV9.

Analisi di western blot per la proteina MFN2 su muscolo di topi adulti MitoCharc1 a 15 giorni dal trattamento intramuscolo con AAV9-shRNAtg2 o con AAV9-MFN2Rtg2. Come controllo, sono stati utilizzati topi MitoCharc1 non trattati. L'actina è stata impiegata per scopi di normalizzazione.

Abbiamo testato l'efficienza del virus anche in topi neonati MitoCharc1. Abbiamo eseguito l'esperimento con iniezione intravena a P1 (100 μ L, AAV9-shRNAtg2 o AAV9-MFN2Rtg2) e abbiamo raccolto il tessuto dopo 3 settimane (P21). L'analisi di western blot eseguita sul fegato dei topi trattati con AAV9-shRNAtg2 mostra una buona riduzione dei livelli della proteina MFN2; nel caso del trattamento con AAV9-MFN2Rtg2 abbiamo osservato un aumento significativo della proteina (Fig 29). Sono in corso le analisi di western blot a livello del cervello e del midollo spinale.

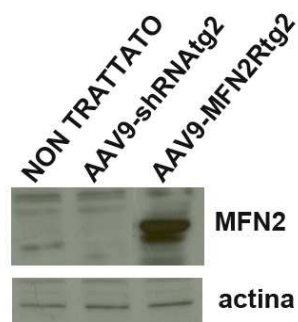


Figura 29. Espressione della proteina MFN2 nel fegato di topi MiotCharc1 dopo somministrazione sistemica con i vettori AAV9.

Analisi di western blot per la proteina MFN2 su fegato di topi MitoCharc1 a 21 giorni dal trattamento (P1; IV) con AAV9-shRNAtg2 o con AAV9-MFN2Rtg2. Come controllo, sono stati utilizzati topi Mitocharc1 non trattati. L'actina è stata impiegata per scopi di normalizzazione.

Alternativamente all'iniezione sistemica, abbiamo testato l'efficacia di un somministrazioneiniezione intracerebroventricolare (ICV) a P0 in associazione all'iniezione sottocutanea (SC) a P0 e P3. Abbiamo iniettato 2 ul di virus AAV9-shRNAtg2 o AAV9-MFN2Rtg2 per iniezione e prelevato il cervello dopo 3 settimane dal trattamento. L'analisi di Western Blot non ha mostrato né il silenziamento della proteina né l'overespressione (Fig 30).

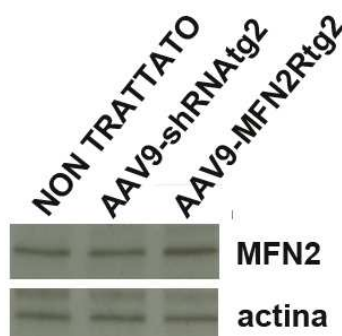


Figura 30. Espressione della proteina MFN2 nel cervello di topi MitoCharc1 dopo somministrazione intracerebroventricolare con i vettori AAV9.

Analisi di western blot per la proteina MFN2 su cervello di topi MitoCharc1 a 21 giorni dal trattamento (ICV a P0 e SC a P0 e P3) con AAV9-shRNA_{tg2} o con AAV9-MFN2R_{tg2}. Come controllo, sono stati utilizzati topi MitoCharc1 non trattati. L'actina è stata impiegata per scopi di normalizzazione.

Sono attualmente in corso esperimenti per ottimizzare i protocolli di produzione degli AAV9 e di somministrazione in modo da raggiungere la miglior efficienza di silenziamento della proteina endogena e di overespressione della proteina esogena. Una volta definito il miglior protocollo, procederemo alla somministrazione combinata dei due vettori per poter così valutare l'efficienza terapeutica in termini di reversione del fenotipo patologico.

5. DISCUSSIONE

La malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2A (CMT2A) è una polineuropatia sensitivo-motoria, caratterizzata da un coinvolgimento dei motoneuroni e dei neuroni sensitivi, che risulta in una progressiva ipostenia agli arti, atrofia muscolare e perdita della sensibilità [1,2]. Mutazioni nel gene *MFN2* sono state identificate come causative della patologia [7,8]. La proteina MFN2, localizzata a livello della membrana mitocondriale esterna, svolge funzioni essenziali nei processi di fusione mitocondriale. I processi di fusione e fissione mitocondriale regolano la forma, la dimensione e il numero dei mitocondri, ma anche la loro corretta localizzazione e le proprietà funzionali come la stabilità del mtDNA e la respirazione cellulare. Considerando quindi il ruolo della MFN2, non sorprende che alterazioni della sua funzione possano portare a difetti dei pathway mitocondriali (fusione, trafficking e mitofagia), che sembrano essere responsabili della patogenesi non solo della CMT2A, ma anche di altre malattie neurodegenerative, più che la conseguenza di un processo di degenerazione già in corso [15,22,28-32].

Ad oggi, non esistono terapie risolutive per questa patologia e i trattamenti attualmente disponibili sono volti a migliorare la qualità di vita dei pazienti, limitandone la sintomatologia. Lo sviluppo di un'efficace strategia terapeutica richiede una più approfondita conoscenza dei meccanismi molecolari della patologia, utili da un lato per identificare nuovi target terapeutici, ma anche per definire biomarcatori del fenotipo patologico, importanti per valutare l'efficacia di una terapia. Il raggiungimento di questo obiettivo richiede l'utilizzo di validi modelli *in vitro* e *in vivo* della malattia.

I modelli *in vitro* attualmente disponibili per gli studi sono principalmente rappresentati da cellule neuronali murine o cellule DRG di ratto, overesprimenti forme wild-type o mutate della proteina MFN2 [26,49]. Questi modelli, pur riproducendo alcuni aspetti del fenotipo patologico,

risultano di difficile utilizzo in quanto l'overespressione di forme wild-type e mutate della MFN2 potrebbero causare alterazioni della funzionalità mitocondriale che risultano dose-dipendenti e che potrebbero essere assenti in cellule che esprimono livelli endogeni di MFN2 mutata [25,220-222]. Questo problema è stato in parte superato mediante l'utilizzo dell'unico tipo cellulare paziente specifico, attualmente disponibile, costituito dai fibroblasti con differenti mutazioni nel gene *MFN2*. In queste cellule, i dati mostrati in merito alla relazione tra mutazioni nel gene *MFN2* e alterazioni tipiche della patologia, come anomalie della morfologia mitocondriale, del contenuto di mtDNA e della capacità respiratoria, risultano però controversi [27,45,46]. Infatti, nei fibroblasti di questi pazienti, in alcuni casi, sono stati osservati difetti solo in alcuni parametri, in altri casi invece le mutazioni nel gene *MFN2* sembrano non essere sufficienti a distruggere i processi di fusione mitocondriale o ad alterare le funzioni mitocondriali. Questi risultati sono in accordo con la specificità neuronale della patologia. Per queste ragioni, i fibroblasti derivati dai pazienti non rappresentano sicuramente il sistema sperimentale più adatto per lo studio dei meccanismi patogenetici della malattia, ma piuttosto un sistema utile per studiare i meccanismi compensatori che proteggono gli altri tessuti dall'insorgenza della patologia. Considerando quindi che la CMT2A è una patologia neuronale, il modello di malattia più idoneo è costituito da cellule neuronali paziente specifiche. Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) rappresentano un valido strumento per ottenere specifiche popolazioni cellulari tra cui i motoneuroni che risultano affetti nella CMT2A. In questo lavoro, abbiamo riprogrammato fibroblasti di un paziente affetto da CMT2A (A283V) utilizzando vettori "Sendai Virus", ciascuno in grado di esprimere uno dei quattro fattori sufficienti per un'efficiente riprogrammazione (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) [131,132,210]. I Sendai virus, a differenza di altri vettori virali che si integrano nel genoma della cellula

ospite, restano a livello citosolico senza integrarsi, ma presentano un'efficienza di trasduzione e di espressione del transgene paragonabile a quella di altri vettori virali integranti [131,132,210]. In questo modo, abbiamo ottenuto e caratterizzato cellule iPS-CMT2A umane che abbiamo successivamente differenziato in motoneuroni, ottimizzando un protocollo già validato nel nostro laboratorio [136]. Il nostro lavoro rappresenta un notevole passo avanti rispetto ai dati presenti in letteratura, perché per la prima volta abbiamo ottenuto e caratterizzato motoneuroni di pazienti CMT2A, generando un valido modello *in vitro* umano di questa malattia. Abbiamo utilizzato questa popolazione cellulare per studiare aspetti del network mitocondriale correlati alla patologia come il trafficking mitocondriale, la stabilità del mtDNA e la funzionalità respiratoria [25,59,223]. Per valutare la specificità neuronale della patologia, l'analisi di questi parametri è stata condotta anche nei fibroblasti derivati dallo stesso paziente.

Il primo parametro investigato nel nostro modello di malattia è stato la localizzazione dei mitocondri, la cui alterazione è stata osservata nei modelli cellulari murini, ma è sempre stata molto controversa nei fibroblasti umani. I nostri risultati mostrano una disomogenea distribuzione dei mitocondri sia nei fibroblasti che nei motoneuroni CMT2A: i mitocondri clasterizzano intorno al nucleo e non si localizzano nella porzione più periferica, come si osserva invece nelle cellule dei soggetti sani. Considerando che la CMT2A è una patologia con un interessamento dei nervi periferici, i cui assoni presentano una notevole polarità e lunghezza, la degenerazione assonale osservata nei pazienti CMT2A potrebbe derivare dalla mancata presenza di mitocondri a livello delle terminazioni nervose proprio a causa di alterazioni del trafficking mitocondriale, dovute a mutazioni nel gene MFN2.

I difetti della localizzazione mitocondriale che abbiamo osservato nelle cellule CMT2A sono in realtà associati, almeno per quanto riguarda le cellule neuronali, ad una riduzione complessiva del numero di mitocondri come mostrato dalla riduzione dei livelli di espressione della proteina mitocondriale Porina. Nel nostro modello, non abbiamo invece osservato alterazioni del potenziale di membrana mitocondriale che svolge un ruolo essenziale nei processi di fusione della membrana mitocondriale interna dipendenti da OPA1 [16].

Successivamente, abbiamo valutato se mutazioni nella proteina MFN2 oltre a causare una disomogenea distribuzione dei mitocondri ne alterassero anche la funzionalità. A questo proposito, abbiamo valutato la quantità di mtDNA mediante un saggio di RT-PCR nei fibroblasti, nelle iPSC e nelle cellule neuronali CMT2A rispetto alle cellule controllo. Nelle iPSC e nei motoneuroni CMT2A è stata osservata una riduzione del contenuto di mtDNA rispetto alle cellule controllo, rispettivamente dell' 80% e 90%; riduzione non osservata invece nei fibroblasti CMT2A. La presenza di una diminuzione della quantità del mtDNA nelle cellule CMT2A potrebbe indicare un'inibizione della replicazione del mtDNA come osservato in patologie mitocondriali caratterizzate da difetti di replicazione del mtDNA [46, 224,225]. L'inibizione del processo di fusione mitocondriale potrebbe privare la cellula del quantitativo sufficiente di substrato necessario per la replicazione e riparazione del mtDNA. A questo proposito, terapie antivirali che alterano la replicazione del mtDNA potrebbero ulteriormente aggravare la sintomatologia dei pazienti CMT2A.

Sulla base dei dati presenti in letteratura, il decremento del contenuto di mtDNA sembra correlato ad una riduzione dell'attività dei complessi della catena respiratoria e ad un aumento delle delezioni del mtDNA [27]. Dalle analisi biochimiche, si osserva una riduzione di attività del complesso II nei fibroblasti e nei MN CMT2A rispetto ai WT, rispettivamente del 55% e del

58%. Anche l'attività della succinato deidrogenasi risulta ridotta del 43% nelle cellule CMT2A rispetto ai WT. Non abbiamo invece osservato delezioni del mtDNA né nei fibroblasti né nei MN CMT2A. L'analisi delle delezioni dovrebbe però essere condotta in cellule ai primi passaggi, evitando così l'insorgenza di meccanismi compensatori che alterino la reale situazione, o meglio ancora nel tessuto muscolare, dove il contenuto mitocondriale è sicuramente più elevato.

Tutte queste analisi ci hanno permesso di ampliare le conoscenze circa i meccanismi patogenetici, evidenziando dei biomarcatori del fenotipo patologico come la disomogenea distribuzione mitocondriale, una riduzione del contenuto di mtDNA e dell'attività dei complessi della catena respiratoria. Tali alterazioni sono sicuramente più evidenti nelle cellule neuronali rispetto ai fibroblasti CMT2A, supportando la specificità neuronale della patologia.

In parallelo agli studi nel modello *in vitro*, le stesse analisi sono state ripetute nell'unico modello murino attualmente disponibile di CMT2A (MitoCharc1) [70], per ampliarne la caratterizzazione e per identificare validi marcatori del fenotipo patologico. Molti aspetti della sua caratterizzazione non sono infatti ancora del tutto definiti e in alcuni casi controversi. Il modello murino MitoCharc1 esprime a livello del sistema nervoso la forma mutata R94Q della proteina MFN2 e presenta difficoltà motorie e una variazione della dimensione degli assoni mielinizzati correlata ad un incremento del numero dei mitocondri in questi assoni a partire dai 5 mesi di età [70]. Nel nostro studio, abbiamo utilizzato lo stesso modello murino, ma abbiamo osservato un fenotipo molto più blando rispetto a quanto descritto nel lavoro di Cartoni. Non abbiamo osservato significative alterazioni delle funzionalità motorie e aspetti patologici nel tessuto muscolare. Poiché la CMT2A si manifesta con un interessamento principalmente a livello dei nervi periferici, le nostre analisi si sono

concentrate a livello del nervo sciatico, focalizzandoci principalmente sulla quantificazione del contenuto mitocondriale con diverse metodiche. La conta dei mitocondri mediante microscopia elettronica nei topi MitoCharc1 ha mostrato nella porzione distale di entrambi i tipi di fibre di diametro maggiore o minore di 3,5 μm una riduzione del numero di mitocondri per assone, rispetto ai controlli (24% nelle fibre <3,5 μm e 33% nelle fibre >3,5 μm). La quantificazione di mtDNA mediante RT-PCR o analisi dell'attività della citrato sintetasi non hanno mostrato alcuna differenza significativa tra topi Mitocharc1 e controlli così come le analisi di western blot volte a valutare i livelli di espressione della proteina mitocondriale Porina. Questi risultati mostrano che nel modello murino di CMT2A si osserva una riduzione del contenuto di mitocondri nella porzione distale degli assoni dovuta probabilmente ad un difetto di trasporto in maniera analoga a quanto riscontrato nel modello *in vitro*. Viceversa, nello studio del gruppo di Cartoni, gli autori hanno osservato un accumulo di mitocondri a livello della porzione distale nel modello CMT2A, giustificato da un difetto nel trasporto retrogrado.

Accanto allo studio dei meccanismi patogenetici della malattia, ci siamo focalizzati sullo sviluppo di una possibile strategia per la CMT2A, basata sul silenziamento del gene *MFN2* causativo della patologia. Tra le metodiche di silenziamento genico a disposizione, ci siamo concentrati sull'RNA interference (RNAi), mai applicato fino ad oggi alla CMT2A. L'RNAi è un processo di silenziamento genico sequenza specifico di tipo post-trascrizionale mediato da piccole molecole di RNA, sintetizzate direttamente dalla cellula (siRNA) oppure di natura esogena (shRNA) [178,226]. Esperimenti condotti in modelli *in vitro* e *in vivo* di diverse patologie, così come i numerosi trial clinici, hanno dimostrato l'efficienza terapeutica di questa strategia [178]. L'RNAi può essere applicato a patologie autosomiche dominanti come la CMT2A, mediante l'utilizzo di

sequenze shRNA capaci di silenziare solo l'allele mutato responsabile della patologia [169,172]. In alternativa, è possibile utilizzare sequenze shRNA in grado di silenziare sia l'allele mutato sia quello wild-type, ripristinando opportuni livelli della proteina utilizzando il cDNA del gene modificato per resistere al processo di silenziamento [176,177]. In questo lavoro di tesi, per la prima volta, nei fibroblasti CMT2A abbiamo silenziato il gene *MFN2* endogeno mediante shRNA e parallelamente, nelle stesse cellule, abbiamo ripristinato i livelli fisiologici della proteina MFN2 attraverso il c-DNA del gene *MFN2* opportunamente modificato per resistere al processo di silenziamento. Rispetto alla strategia di silenziamento allele specifico, la nostra strategia ha sicuramente notevoli punti di forza. Può essere applicata a tutti i pazienti CMT2A indipendentemente dalla mutazione presente nel gene *MFN2* e non presenta problemi legati alla specificità di discriminare l'allele mutato dal wild-type. Poiché i due alleli differiscono per un singolo nucleotide, si osserva solitamente anche il silenziamento di una quota dell'allele wild-type soprattutto ad alte concentrazioni di shRNA, rischiando di non mantenere livelli sufficienti di MFN2 endogena. Se da un lato vi sono numerosi vantaggi, bisogna anche considerare la necessità di avere efficienti sistemi di trasfezione soprattutto visto l'utilizzo di due vettori differenti e la difficoltà di regolare i livelli di MFN2 endogena. Un elevato aumento dei livelli di proteina wild-type potrebbe comunque generare degli effetti collaterali inaspettati, anche per le eventuali differenze di funzioni tra la proteina endogena e quella esogena.

Basandoci sui dati positivi ottenuti *in vitro*, abbiamo applicato questa strategia nel modello murino di CMT2A, focalizzandoci sulla scelta del veicolo di somministrazione e sulla modalità di iniezione, aspetti molto importanti per la natura neuronale della patologia e la necessità quindi di superare la barriera ematoencefalica, raggiungendo il sistema nervoso.

Recentemente, il gruppo del Prof. Kaspar ha dimostrato che la terapia genica con vettori adeno associati 9 (AAV9), veicolanti geni difettivi nella patologia o costrutti silenzianti determina un miglioramento delle funzioni motorie e della fisiologia neuromuscolare in modelli animali di diverse malattie neurodegenerative come la SMA e la SLA [203,205,209]. I vettori AAV9 hanno mostrato un maggiore tropismo per i motoneuroni, tipologia cellulare affetta anche nella CMT2A. Nel nostro progetto abbiamo utilizzato vettori AAV9 come veicolo per lo shRNA e per il c-DNA del gene MFN2 modificato. La somministrazione muscolare di questi vettori nel modello murino ha mostrato un'elevata efficienza di silenziamento della proteina MFN2 endogena e di overespressione di quella esogena nel tessuto stesso, dimostrando l'efficienza dei nostri costrutti.

Per la traslabilità clinica di una strategia terapeutica, altrettanto critica in associazione alla scelta del veicolo, è la via di somministrazione. A questo proposito, rimane aperta ancora la questione se per malattie come la CMT2A sia sufficiente una somministrazione direttamente a livello del sistema nervoso centrale o se sia necessario ricorrere ad una somministrazione sistemica. In questo lavoro, abbiamo testato entrambe le strategie, in base ai dati dei lavori presenti in letteratura su altri modelli animali di malattie neurodegenerative. In entrambi i casi, abbiamo deciso di trattare gli animali in fase presintomatica a 1 giorno di vita anche per ottenere una migliore diffusione nel sistema nervoso centrale grazie ad una maggiore permeabilità della barriera ematoencefalica. Risultati soddisfacenti, seppur preliminari, sono stati ottenuti mediante somministrazione sistemica. Dopo 21 giorni dal trattamento abbiamo osservato nel fegato dei topi trattati il silenziamento della proteina MFN2 endogena e l'overespressione di quella esogena. Sono attualmente in corso le analisi sui tessuti neuronali tra cui cervello e midollo spinale per valutare l'efficienza del trattamento. Risultati significativi non sono stati

osservati per il momento con la somministrazione diretta nel sistema nervoso centrale. Sono in corso esperimenti per ottimizzare il protocollo di produzione degli AAV 9 e di somministrazione al fine di ottenere il marcato aumento della proteina esogena e il silenziamento di quella endogena con tutti i tipi di somministrazione.

In conclusione, questo studio ha contribuito ad approfondire i meccanismi molecolari patogenetici attraverso la generazione di un modello *in vitro* di CMT2A con iPSC paziente specifico e di identificare una possibile strategia terapeutica per la CMT2A, potenzialmente traslabile in clinica.

6. CONCLUSIONI

La CMT2A, neuropatia assonale ereditaria causata da mutazioni del gene MFN2, rappresenta una delle più frequenti malattie neuromuscolari ereditarie. Attualmente non esiste una terapia risolutiva. Lo studio dei meccanismi responsabili di tale patologia così come l'identificazione di possibili terapie sono ostacolati anche dalla difficoltà di ottenere neuroni motori e sensitivi, affetti nella patologia. La possibilità di riprogrammare cellule somatiche mature in iPSC ha permesso di ottenere cellule paziente specifiche, utili come modello *in vitro* della patologia oltre che per testare possibili terapie. In questo studio abbiamo contribuito ad approfondire i meccanismi patogenetici attraverso la generazione di un modello *in vitro* di CMT2A con iPSC paziente specifico e ad identificare una possibile strategia terapeutica per la CMT2A.

Inizialmente, abbiamo generato iPSC da un paziente CMT2A con un metodo virale di tipo non integrante e le abbiamo differenziate in motoneuroni paziente specifici, ottenendo il primo modello *in vitro* della malattia costituito da neuroni umani paziente specifici. Queste cellule neuronali hanno mostrato alterazione della localizzazione dei mitocondri, una riduzione della quantità di DNA mitocondriale e dell'attività dei complessi della catena respiratoria, confermando la specificità neuronale della patologia. Sono attualmente in corso esperimenti di riprogrammazione di fibroblasti derivati da pazienti CMT2A con differenti mutazioni nel gene MFN2 per ottenere linee di iPSC in cui studiare l'effetto di ciascuna mutazione sul network mitocondriale. In parallelo, stiamo ottimizzando protocolli per differenziare le cellule iPS non solo in motoneuroni ma anche in neuroni sensitivi anche essi affetti nella patologia.

La quantificazione del contenuto di mitocondri è stata valutata come biomarcatore del fenotipo patologico anche sul nervo sciatico del modello murino di CMT2A (MiotCharc1) con metodiche di microscopia elettronica,

RT-PCR e analisi biochimiche rilevando una riduzione del numero di mitocondri nella porzione distale, ma non nel contenuto complessivo. L'utilizzo di questo modello richiederà in futuro analisi più dettagliate al fine di identificare un marcatore specifico ad oggi non ancora disponibile.

In parallelo, ci siamo focalizzati sullo sviluppo di un approccio terapeutico per questa patologia. Abbiamo silenziato il gene MFN2 endogeno mediante short harpin RNA (shRNA) nei fibroblasti CMT2A. In parallelo, nelle stesse cellule, per ripristinare i normali livelli di espressione del gene MFN2, abbiamo introdotto il c-DNA del gene MFN2 modificato in modo da resistere al processo di silenziamento. I risultati ottenuti con questa strategia nei fibroblasti CMT2A sono stati molto promettenti. Sono attualmente in corso esperimenti nei motoneuroni CMT2A in modo da valutare l'efficienza terapeutica di questa strategia. Abbiamo ottenuto alcuni dati preliminari anche nel modello murino, definendo il vettore AAV9 come il miglior veicolo di somministrazione dei nostri costrutti, vista la sua capacità di trasdurre i motoneuroni tipicamente affetti nella patologia. In questi primi esperimenti, la modalità di somministrazione sistemica ha mostrato una maggiore efficienza di silenziamento della proteina MFN2 endogena e di overespressione della proteina esogena, rispetto a quella intracerebroventricolare. In futuro, ottimizzeremo il protocollo di produzione degli AAV9 e di somministrazione al fine di ottenere il marcato aumento della proteina esogena e il silenziamento di quella endogena con tutti i tipi di somministrazione. Una volta definito il protocollo di somministrazione, procederemo alla verifica dell'efficacia terapeutica di questa strategia valutando il miglioramento del fenotipo neuropatologico del modello murino.

BIBLIOGRAFIA

1. Vance J.M., "The many faces of Charcot-Marie-Tooth disease", *Archives of Neurology*, Vol. 57, no. 5, 2000, pp. 638–640.
- 2 Harding A. E., Thomas P. K., "The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II," *Brain*, Vol. 103, no. 2, 1980, pp. 259–280.
3. Klein C.J., Dyck P.J., "Genetic testing in inherited peripheral neuropathies", *J Peripher Nerv Syst.*, Vol. 10, no. 1, 2005, pp.77-84.
4. Verhoeven K., Claeys K.G., Züchner S., Schröder J.M., Weis J., Ceuterick C., Jordanova A., Nelis E., De Vriendt E., Van Hul M., Seeman P., Mazanec R., Saifi G.M., Szigeti K., Mancias P., Butler I.J., Kochanski A., Ryniewicz B., De Bleecker J., Van den Bergh P., Verellen C., Van Coster R., Goemans N., Auer-Grumbach M., Robberecht W., Milic Rasic V., Nevo Y., Tournev I., Guergueltcheva V., Roelens F., Vieregge P., Vinci P., Moreno M.T., Christen H.J., Shy M.E., Lupski J.R., Vance J.M., De Jonghe P., Timmerman V., "MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2", *Brain*, Vol.129, no. 8, 2006, pp. 2093-2102.
5. Barisic N., Claeys K.G., Sirotković-Skerlev M., Löfgren A., Nelis E., De Jonghe P., Timmerman V., "Charcot-Marie-Tooth disease: a clinico-genetic confrontation", *Ann Hum Genet.*, Vol. 72, no. 72, 2008, pp. 416-41.
6. Polke J.M., Laurá M., Pareyson D., Taroni F., Milani M., Bergamin G., Gibbons V.S., Houlden H., Chamley S.C., Blake J., Devile C.,

Sandford R., Sweeney M.G., Davis M.B., Reilly M.M., "Recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to compound heterozygous mitofusin 2 mutations", *Neurology*, Vol. 77, 2011, pp. 168-73.

7. Züchner S., Mersiyanova I.V., Muglia M., Bissar-Tadmouri N., Rochelle J., Dadali E.L., Zappia M., Nelis E., Patitucci A., Senderek J., Parman Y., Evgrafov O., Jonghe P.D., Takahashi Y., Tsuji S., Pericak-Vance M.A., Quattrone A., Battaloglu E., Polyakov A.V., Timmerman V., Schröder J.M., Vance J.M., "Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A", *Nat Genet.*, Vol. 36, no. 5, 2004, pp. 449-451.

8. Kijima K., Numakura C., Izumino H., Umetsu K., Nezu A., Shiiki T., Ogawa M., Ishizaki Y., Kitamura T., Shozawa Y., Hayasaka K., "Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A", *Hum Genet.*, Vol. 116, no. 1, 2005, pp. 23-27.

9. Chung K.W., Kim S.B., Park K.D., Choi K.G., Lee J.H., Eun H.W., Suh J.S., Hwang J.H., Kim W.K., Seo B.C., Kim S.H., Son I.H., Kim S.M., Sunwoo I.N., Choi B.O., "Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations", *Brain*, Vol. 129, no. 8, 2006, pp. 2103–2118.

10. Dyck P. J., Chance P., Lebo R., Carney J. A., "Hereditary motor and sensory neuropathy", *Peripheral Neuropathy*, Vol. 2, 1993, pp. 1094–1136.

11. Zhu D., Kennerson M. L., Walizada G., Züchner S., Vance J.M., Nicholson G.A., "Charcot-Marie-Tooth with pyramidal signs is

genetically heterogeneous: families with and without MFN2 mutations”, *Neurology*, Vol. 65, no. 3, 2005, pp. 496–497.

12. Züchner S., De Jonghe P., Jordanova A., Claeys K.G., Guergueltcheva V., Cherninkova S., Hamilton S.R., Van Stavern G., Krajewski K.M., Stajich J., Tournev I., Verhoeven K., Langerhorst C.T., de Visser M., Baas F., Bird T., Timmerman V., Shy M., Vance JM., “Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2”, *Annals of Neurology*, Vol. 59, no. 2, 2006, pp. 276–281.

13. Chalmers R.M., Bird A.C., Harding A.E., “Autosomal dominant optic atrophy with asymptomatic peripheral neuropathy”, *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, Vol. 60, no. 2, 1996, pp. 195–196.

14. Züchner S., “Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A”, *GeneReviews*, University of Washington, Seattle, 1993-2014.

15. Ranieri M., Brajkovic S., Riboldi G., Ronchi D., Rizzo F., Bresolin N., Corti S., Comi G.P., “Mitochondrial fusion proteins and human diseases”, *Neurol Res Int.*, 2013.

16. Milone M., Benarroch E.E., “Mitochondrial dynamics: general concepts and clinical implications”, *Neurology*, Vol. 78, no. 20, 2012, pp. 1612-1619.

17. Casasnovas C., Banchs I., Cassereau J., Gueguen N., Chevrollier A., Martínez-Matos J.A., Bonneau D., Volpini V., “Phenotypic spectrum

of MFN2 mutations in the Spanish population”, *J Med Genet.*, Vol. 47, no. 4, 2010, pp. 249-256.

18. Honda S., Aihara T., Hontani M., Okubo K., Hirose S., “Mutational analysis of action of mitochondrial fusion factor mitofusin-2.” *J Cell Sci.*, Vol. 118, no. 14, 2005, pp. 3153-61.

19. Bombelli F., Stojkovic T., Dubourg O., Echaniz-Laguna A., Tardieu S., Larcher K., Amati-Bonneau P., Latour P., Vignal O., Cazeneuve C., Brice A., Leguern E., “Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2A. From Typical to Rare Phenotypic and Genotypic Features”, *JAMA Neurol.*, Vol. 71, no. 8, 2014, pp. 1036-1042.

20. Calvo J., Funalot B., Ouvrier R.A., Lazaro L., Toutain A., De Mas P., Bouche P., Gilbert-Dussardier B., Arne-Bes M.C., Carrière J.P., Journal H., Minot-Myhie M.C., Guillou C., Ghorab K., Magy L., Sturtz F., Vallat J.M., Magdelaine C., “Genotype-phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2 caused by mitofusin 2 mutations”, *Arch Neurol.*, Vol. 66, no.12, 2009, pp. 1511-1516.

21. Bergamin G., Dalla Torre C., Cacciavillani M., Lucchetta M., Boaretto F., Campagnolo M., Mostacciolo M.L., Biani C., “Novel mutation of the mitofusin 2 gene in a family with Charcot-Marie-Tooth disease type 2”, *Muscle Nerve*, Vol.49, no.1, pp. 145-146.

22. Schon E.A., Przedborski S., “Mitochondria: the next (neurode)generation”, *Neuron*, Vol. 70, no.6, 2011, pp. 103. Review.

23. Sajic M., Mastrolia V., Lee C.Y., Trigo D., Sadeghian M., Mosley A.J., Gregson N.A., Duchen M.R., Smith K.J., "Impulse conduction increases mitochondrial transport in adult mammalian peripheral nerves in vivo", *PLoS Biol.*, Vol. 11, no.12, 2013, e1001754.
- 24 Fischer F., Hamann A., Osiewacz HD., "Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways", *Trends Biochem Sci.*, Vol. 37, no. 7, 2012, pp. 284-92.
25. Detmer S.A., Chan D.C., "Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations", *J Cell Biol.*, Vol. 176, no4, 2007, pp. 405-414.
26. Baloh R.H., Schmidt R.E., Pestronk A., Milbrandt J., "Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations", *J Neurosci.*, Vol. 27, no. 2, 2007, pp. 422-430.
- 27 Vielhaber S., Debska-Vielhaber G., Peeva V., Schoeler S., Kudin A.P., Minin I., Schreiber S., Dengler R., Kollewe K., Zusratter W., Kornblum C., Zsurka G., Kunz W.S., "Mitofusin 2 mutations affect mitochondrial function by mitochondrial DNA depletion", *Acta Neuropathol.*, Vol. 125, no.2, 2013, pp. 245-256.
28. Itoh K., Nakamura K., Iijima M., Sesaki H., "Mitochondrial dynamics in neurodegeneration", *Trends Cell Biol.*, Vol. 23, no. 2, 2013, pp. 64-71.

30. Pathak D., Berthet A., Nakamura K., "Energy failure: does it contribute to neurodegeneration?", *Ann Neurol.*, Vol. 74, no. 4, 2013, pp. 506-516.
31. Duncan J.E., Goldstein L.S., "The genetics of axonal transport and axonal transport disorders", *PLoS Genet.*, Vol. 2, no. 9, 2006, pp. 124. Review.
32. De Vos K.J., Sable J., Miller K.E., Sheetz M.P., "Expression of phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate-specific pleckstrin homology domains alters direction but not the level of axonal transport of mitochondria", *Mol Biol Cell.*, Vol. 14, no.9, 2003, pp. 3636-3649.
33. Chen H., Detmer S.A., Ewald A.J., Griffin E.E., Fraser S.E., Chan D.C., "Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development", *J Cell Biol.*, Vol. 160, no. 2, 2003, pp. 189-200.
34. Wang W., Li L., Lin W.L., Dickson D.W., Petrucelli L., Zhang T., Wang X., "The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons", *Hum Mol Genet.*, Vol. 22, no. 23, 2013, pp. 4706-4719.
35. Chen H., Chan D.C., "Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission", *Hum Mol Genet.*, Vol. 14, no. 2, 2005, pp. 283-289. Review.
36. Bui M., Gilady S.Y., Fitzsimmons R.E., Benson M.D., Lynes E.M., Gesson K., Alto N.M., Strack S., Scott J.D., Simmen T., "Rab32

modulates apoptosis onset and mitochondria-associated membrane (MAM) properties”, *J Biol Chem.*, vol 285, no. 41, 2010, pp. :31590-31602.

37. Cipolat S., Martins de Brito O., Dal Zilio B., Scorrano L., “OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion”. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, no. 45, 2004, pp. 15927-15932.

38. Ishihara N., Eura Y., Mihara K., “Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity”, *J Cell Sci.*, vol. 117, no. 26, pp. 6535-6546.

39. Mishra P., Carelli V., Manfredi G., Chan D.C., “Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation”. *Cell Metab.*, vol. 19, no. 4, 2014, pp. 630-641.

40. Milone M., Benarroch E.E., “Mitochondrial dynamics: general concepts and clinical implications”. *Neurology*, Vol. 78, no. 20, 2012, pp. 1612-1619.

41. Yoon Y., Krueger E.W., Oswald B.J., McNiven M.A., “The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1”, *Mol Cell Biol.*, Vol. 23, no. 15, 2003, pp. 5409-5420.

42. Palmer C.S., Osellame L.D., Laine D., Koutsopoulos O.S., Frazier A.E., Ryan M.T., “MiD49 and MiD51, new components of the

mitochondrial fission machinery”, *EMBO Rep.*, Vol. 12, no. 6, 2011, pp. 565-73.

43. Chappie J.S., Acharya S., Leonard M., Schmid S.L., Dyda F., “G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity”, *Nature*, Vol. 456, no. 7297, 2010, pp. 435-440.

44. Mears J.A., Lackner L.L., Fang S., Ingberman E., Nunnari J., Hinshaw J.E., “Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission”, *Nat Struct Mol Biol.*, Vol. 18, no. 1, 2011, pp. 20-26.

45. Loiseau D., Chevrollier A., Verny C., Guillet V., Gueguen N., Pou de Crescenzo M.A., Ferré M., Malinge M.C., Guichet A., Nicolas G., Amati-Bonneau P., Malthiery Y., Bonneau D., Reynier P., “Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease”, *Ann Neurol.*, Vol. 61, no. 4, 2007, pp. 315-323.

46. Amiott E.A., Lott P., Soto J., Kang P.B., McCaffery J.M., DiMauro S., Abel E.D., Flanigan K.M., Lawson V.H., Shaw J.M., “Mitochondrial fusion and function in Charcot-Marie-Tooth type 2A patient fibroblasts with mitofusin 2 mutations”, *Exp Neurol.*, Vol. 211, no. 1, 2008, pp. 115-127.

47. Sheng Z.H., “Mitochondrial trafficking and anchoring in neurons: New insight and implications”, *J Cell Biol.*, Vol. 204, no. 7, 2014, pp. 1087-1098.

48. de Brito O.M., Scorrano L., "Mitofusin 2: a mitochondria-shaping protein with signaling roles beyond fusion", *Antioxid Redox Signal.*, Vol. 10, no.3, 2008, pp. 621-633. Review.
49. Misko A., Jiang S., Wegorzewska I., Milbrandt J., Baloh R.H., "Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex", *J Neurosci.*, Vol. 30, no. 12, 2010, pp. 4232-4240.
50. Pilling A.D., Horiuchi D., Lively C.M., Saxton W.M., "Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons". *Mol Biol Cell.*, Vol. 17, no. 4, 2006, pp. 2057-68.
51. Koutsopoulos O.S., Laine D., Osellame L., Chudakov D.M., Parton R.G., Frazier A.E., Ryan M.T., "Human Mitons associate with mitochondria and induce microtubule-dependent remodeling of mitochondrial networks", *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1803, no. 5, 2010, pp. 564-574.
52. Miller K.E., Sheetz M.P., "Axonal mitochondrial transport and potential are correlated". *J Cell Sci.*, Vol. 117, no. 13, 2004, pp. 2791-2804.
53. Saotome M., Safiulina D., Szabadkai G., Das S., Fransson A., Aspenstrom P., Rizzuto R., Hajnóczky G., "Bidirectional Ca^{2+} -dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase". *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. 105, no. 52, 2008, pp. 20728-20733.

54. Kang J.S., Tian J.H., Pan P.Y., Zald P., Li C., Deng C., Sheng Z.H., "Docking of axonal mitochondria by syntaphilin controls their mobility and affects short-term facilitation", *Cell*, Vol. 132, no.1, 2008, pp. 137-148.
55. Chen Y.M., Gerwin C., Sheng Z.H., "Dynein light chain LC8 regulates syntaphilin-mediated mitochondrial docking in axons", *J Neurosci*, Vol. 29, no. 30, 2009, pp. 9429-9438.
56. Hailey D.W., Rambold A.S., Satpute-Krishnan P., Mitra K., Sougrat R., Kim P.K., Lippincott-Schwartz J., "Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation", *Cell*, Vol. 141, no. 4, 2010, pp. 656-667.
57. Rezzani R., Stacchiotti A., Rodella L.F., "Morphological and biochemical studies on aging and autophagy", *Ageing Res Rev.*, Vol. 11, no. 1, 2012, pp. 10-31.
58. Webster B.R., Scott I., Traba J., Han K., Sack M.N., "Regulation of autophagy and mitophagy by nutrient availability and acetylation", *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1841, no. 4, 2014, pp. 525-534.
59. Chen H., Chan DC., "Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement, and mitophagy in neurodegenerative diseases", *Hum Mol Genet.*, Vol. 18, no. 2, 2009, pp. 169-176.
60. Fu M., St-Pierre P., Shankar J., Wang P.T., Joshi B., Nabi I.R., "Regulation of mitophagy by the Gp78 E3 ubiquitin ligase", *Mol Biol Cell*, Vol. 24, no. 8, 2013, pp. 1153-1162.

61. Tanaka A., Cleland M.M., Xu S., Narendra D.P., Suen D.F., Karbowski M., Youle R.J., "Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin", *J Cell Biol.*, Vol. 191, no. 7, 2010, pp. 1367-1380.
62. Gegg M.E., Cooper J.M., Chau K.Y., Rojo M., Schapira A.H., Taanman J.W., "Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy", *Hum Mol Genet.*, Vol. 19, no.24, 2010, pp. 4861-4870.
63. Chen Y., Dorn G.W., "PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria", *Science*, Vol. 340, no. 6131, 2013, pp. 471-475.
64. Ghavami S., Shojaei S., Yeganeh B., Ande S.R., Jangamreddy J.R., Mehrpour M., Christoffersson J., Chaabane W., Moghadam A.R., Kashani H.H., Hashemi M., Owji A.A., Łos M.J., "Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders". *Prog Neurobiol.*, Vol.112, pp. 24-49.
65. Ngoh G.A., Papanicolaou K.N., Walsh K., "Loss of mitofusin 2 promotes endoplasmic reticulum stress". *J Biol Chem.*, Vol. 287, no. 24, 2012, pp. 20321-20332.
66. Bhandari P., Song M., Chen Y., Burrelle Y., Dorn G.W., "Mitochondrial contagion induced by Parkin deficiency in Drosophila hearts and its containment by suppressing mitofusin", *Circ Res.*, Vol.114, no. 2, 2014, pp. 257-265.

67. Vettori A., Bergamin G., Moro E., Vazza G., Polo G., Tiso N., Argenton F., Mostacciuolo M.L., “Developmental defects and neuromuscular alterations due to mitofusin 2 gene (MFN2) silencing in zebrafish: a new model for Charcot-Marie-Tooth type 2A neuropathy”. *Neuromuscul Disord.*, Vol. 21, no. 1, 2011, pp. 58-67.
68. Chen H., McCaffery J.M., Chan D.C., “Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum”. *Cell*, Vol. 130, 2007; pp. 548–562.
69. Detmer S.A., Vande Velde C., Cleveland D.W., Chan D.C., “Hindlimb gait defects due to motor axon loss and reduced distal muscles in a transgenic mouse model of Charcot-Marie-Tooth type 2A”. *Hum Mol Genet*, Vol. 17, 2008; pp. 367–375.
70. Cartoni R., Arnaud E., Médard J.J., Poirot O., Courvoisier D.S., Chrast R., Martinou J.C., “Expression of mitofusin 2(R94Q) in a transgenic mouse leads to Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A”. *Brain*, Vol. 133, no. 5, 2010, pp. 1460-1469.
71. Guillet V., Gueguen N., Cartoni R., Chevrollier A., Desquiret V., Angebault C., Amati-Bonneau P., Procaccio V., Bonneau D., Martinou J.C., Reynier P., “Bioenergetic defect associated with mKATP channel opening in a mouse model carrying a mitofusin 2 mutation”, *FASEB J*, Vol. 25, no. 5, 2011, pp. 1618-1627.
72. Sames L., Moore A., Arnold R., Ekins S., “Recommendations to enable drug development for inherited neuropathies: Charcot-Marie-Tooth and Giant Axonal Neuropathy”, 2014.

73. Eldridge C.F., Bunge M.B., Bunge R.P., Wood P.M., "Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro. Ascorbic acid regulates basal lamina assembly and myelin formation", *J Cell Biol.*, Vol. 105, no. 2, 1987, pp. 1023-1034.
74. Passage E., Norreel J.C., Noack-Fraissignes P., Sanguedolce V., Pizant J., Thirion X., Robaglia-Schlupp A., Pellissier J.F., Fontés M., "Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease", *Nat Med.*, Vol. 10, no. 4, 2004, pp. 396-401.
75. Lewis R.A., McDermott M.P., Herrmann D.N., Hoke A., Clawson L.L., Siskind C., Feely S.M., Miller L.J., Barohn R.J., Smith P., Luebke E., Wu X., Shy M.E.; "Muscle Study Group. High-dosage ascorbic acid treatment in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: results of a randomized, double-masked, controlled trial". *JAMA Neurol.*, Vol. 70, no. 8, 2013, pp. 981-987.
76. Folkers K., Simonsen R., "Two successful double-blind trials with coenzyme Q10 (vitamin Q10) on muscular dystrophies and neurogenic atrophies", *Biochim Biophys Acta.*, Vol. 1271, no. 1, 1995, pp. 281-286.
77. Sahenk Z., Nagaraja H.N., McCracken B.S., King W.M., Freimer M.L., Cedarbaum J.M., Mendell J.R., "NT-3 promotes nerve regeneration and sensory improvement in CMT1A mouse models and in patients", *Neurology*. Vol. 65, no. 5, 2005, pp. 681-689.
78. Khajavi M., Inoue K., Wiszniewski W., Ohyama T., Snipes G.J., Lupski J.R., "Curcumin treatment abrogates endoplasmic reticulum

retention and aggregation-induced apoptosis associated with neuropathy-causing myelin protein zero-truncating mutants”, *Am J Hum Genet.*, Vol. 77, no. 5, 2005 pp. 841-50.

79. Khajavi M., Shiga K., Wiszniewski W., He F., Shaw C.A., Yan J., Wensel T.G., Snipes G.J., Lupski J.R., “Oral curcumin mitigates the clinical and neuropathologic phenotype of the Trembler-J mouse: a potential therapy for inherited neuropathy”, *Am J Hum Genet.*, Vol. 81, no. 3, 2007, pp. 438-453.

80. Sereda M.W., Meyer zu Hörste G., Suter U., Uzma N., Nave K.A., “Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A)”, *Nat Med.*, Vol. 9, no. 12, 2003, pp. 1533-1537.

81. Meyer zu Horste G., Prukop T., Liebetanz D., Mobius W., Nave K.A., Sereda M.W., “Antiprogesterone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy”, *Ann Neurol.*, Vol. 61, no. 1, 2007, pp. 61-72.

82. Flax J.D., Aurora S., Yang C., Simonin C., Wills A.M., Billingham L.L., Jendoubi M., Sidman R.L., Wolfe J.H., Kim S.U., Snyder E.Y., “Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes”, *Nat Biotechnol.*, Vol. 16, no. 11, 1998, pp. 1033-1039.

83. Park K.I., Lachyankar M., Nissim S., Snyder E.Y., “Neural stem cells for CNS repair: state of the art and future directions”, *Adv Exp Med Biol.*, Vol. 506, 2002, pp. 1291-1296.

84. Corti S., Locatelli F., Papadimitriou D., Donadoni C., Del Bo R., Crimi M., Bordoni A., Fortunato F., Strazzer S., Menozzi G., Salani S., Bresolin N., Comi G.P., "Transplanted ALDHhiSSClo neural stem cells generate motor neurons and delay disease progression of nmd mice, an animal model of SMARD1", *Hum Mol Genet.* Vol. 15, no. 2, 2006, pp. 167-187.

85. Corti S., Locatelli F., Papadimitriou D., Del Bo R., Nizzardo M., Nardini M., Donadoni C., Salani S., Fortunato F., Strazzer S., Bresolin N., Comi G.P., "Neural stem cells LewisX+ CXCR4+ modify disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model", *Brain.*, Vol. 130, 2007, pp. 1289-1305.

86. Corti S., Nizzardo M., Nardini M., Donadoni C., Salani S., Ronchi D., Saladino F., Bordoni A., Fortunato F., Del Bo R., Papadimitriou D., Locatelli F., Menozzi G., Strazzer S., Bresolin N., Comi G.P., "Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy", *J Clin Invest.*, Vol. 118, no. 10, 2008, pp. 3316-30.

87 Corti S., Nizzardo M., Nardini M., Donadoni C., Salani S., Del Bo R., Papadimitriou D., Locatelli F., Mezzina N., Gianni F., Bresolin N., Comi G.P., "Motoneuron transplantation rescues the phenotype of SMARD1 (spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1)", *J Neurosci.*, Vol. 29, no. 38, 2009, pp. 11761-11771.

88. Corti S., Nizzardo M., Nardini M., Donadoni C., Salani S., Ronchi D., Simone C., Falcone M., Papadimitriou D., Locatelli F., Mezzina N., Gianni F., Bresolin N., Comi G.P., "Embryonic stem cell-derived neural

stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice”, *Brain*, Vol. 133, 2010, pp. 465-481.

89. Papadeas S.T., Maragakis N.J., “Advances in stem cell research for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Opin Biotechnol*”, Vol. 20, no. 5, 2009, pp. 545-551.

90. Nizzardo M., Simone C., Falcone M., Locatelli F., Riboldi G., Comi G.P., Corti S., “Human motor neuron generation from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells”, *Cell Mol Life Sci.*, Vol. 67, no. 22, pp. 2010, pp. 3837-3847.

91. Nizzardo M., Simone C., Rizzo F., Ruggieri M., Riboldi G., Salani S., Bucchia M., Bresolin N., Comi G.P., Corti S., “iPSC-derived neural stem cells act via kinase inhibition to exert neuroprotective effects in Spinal Muscular Atrophy with Respiratory Distress Type 1”. In press, *Stem Cell Report*.

92. Leal A., Ichim T.E., Marleau A.M., Lara F., Kaushal S., Riordan N.H., “Immune effects of mesenchymal stem cells: implications for Charcot-Marie-Tooth disease”, *Cell Immunol.*, Vol. 253, no. 1, 2008, pp. 11-5.

93. Mitalipov S., Wolf D. “Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming”, *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, Vol. 14, 2009, pp. 185-199.

94. Martin G.R., "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells", *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 78, no. 12, 1981, pp. 7634-7638.
95. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M., "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts", *Science*, Vol. 282, 1998, pp. 1145–1147.
96. Smith A.G., Heath J.K., Donaldson D.D., Wong G.G., Moreau J., Stahl M., Rogers D., "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides", *Nature*, Vol. 15, no. 336, 1988, pp. 688-690.
97. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. "Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells", *Nature*, Vol. 15, no. 336, 1988, pp. 684-687.
98. Nichols J., Evans E.P., Smith A.G., "Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity", *Development*, Vol. 110, no. 4, 1990, pp. 1341-1348.
99. Wichterle H., Lieberam I., Porter J.A., Jessell T.M., "Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons", *Cell*, Vol. 110, no. 3, 2002, pp. 385-397.
100. Barberi T., Klivenyi P., Calingasan N.Y., Lee H., Kawamata H., Loonam K., Perrier A.L., Bruses J., Rubio M.E., Topf N., Tabar V.,

Harrison N.L., Beal M.F., Moore M.A., Studer L., "Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice", *Nat Biotechnol.*, Vol. 21, no. 10, 2003, pp. 1200-1207.

101. Roy N.S., Cleren C., Singh S.K., Yang L., Beal M.F., Goldman S.A., "Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes", *Nat Med.*, Vol. 12, no. 11, 2006, pp. 1259-1268.

102. Watanabe K., Kamiya D., Nishiyama A., Katayama T., Nozaki S., Kawasaki H., Watanabe Y., Mizuseki K., Sasai Y., "Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells", *Nat Neurosci.*, Vol. 8, no. 3, 2005, pp. 288-296.

103. Gossrau G., Thiele J., Konang R., Schmandt T., Brüstle O., "Bone morphogenetic protein-mediated modulation of lineage diversification during neural differentiation of embryonic stem cells", *Stem Cells*, Vol. 25, no. 4, 2007, pp. 939-949.

104. Glaser T., Brüstle O., "Retinoic acid induction of ES-cell-derived neurons: the radial glia connection", *Trends Neurosci.*, Vol. 28, no. 8, 2005, pp. 397-400.

105. Nistor G.I., Totoiu M.O., Haque N., Carpenter M.K., Keirstead H.S., "Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation", *Glia*, Vol. 49, no. 3, 2005, pp. 385-396.

106. Tsuchiya H., Harashima H., Kamiya H., "Increased SFHR gene correction efficiency with sense single-stranded DNA", *J Gene Med.*, Vol. 7, no. 4, 2005, pp. 486-493.
107. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A., "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells", *Science*, Vol. 318, 2007, pp. 1917–1920.
108. Okamoto K., Okazawa H., Okuda A., "A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells". *Cell*, Vol. 60, 1990, pp. 461–472.
109. Schöler H.R., Hatzopoulos A.K., Balling R., Suzuki N., Gruss P., "A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germlinespecific expression of an Oct factor", *EMBO J.*, Vol. 8, 1989, pp. 2543–2550.
110. Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G., "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells", *Nat. Genet.*, Vol. 24, 2000, pp. 372–376.
111. Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Schöler H., Smith A., "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4", *Cell*, Vol. 95, 1998, pp. 379–391.

112. Zaehres H., Lensch M.W., Daheron L., Stewart S.A., Itskovitz-Eldor J., Daley G.Q., “High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells”, *Stem Cells*, Vol. 23, 2005, pp. 299–305.
113. Avilion A.A., Nicolis S.K., Pevny L.H., Perez L., Vivian N., Lovell-Badge R., “Multipotent cell lineages in early mouse development depend on Sox2 function”, *Genes Dev.*, Vol. 17, 2003, pp. 126–140.
114. Ivanova N., Dobrin R., Lu R., Kotenko I., Levorse J., DeCoste C., Schafer X., Lun Y., Lemischka I.R., “Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference”, *Nature*, Vol. 442, 2006, pp. 533–538.
115. Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y., Shimosato D., Yagi R., Takahashi K., Okochi H., Okuda A., Matoba R., Sharov A.A., Ko M.S., Niwa H., “Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells”, *Nat. Cell Biol.*, Vol. 9, 2007, pp. 625–635.
116. Chambers I., Colby D., Robertson M., Nichols J., Lee S., Tweedie S., Smith A., “Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells”, *Cell* Vol. 113, 2003, pp. 643–655.
117. Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., Segawa K., Murakami M., Takahashi K., Maruyama M., Maeda M., Yamanaka S., “The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells”, *Cell*, Vol. 113, 2003, pp. 631–642.

118. Hough S.R., Clements I., Welch P.J., Wiederholt K.A., “Differentiation of mouse embryonic stem cells after RNA interference-mediated silencing of Oct4 and Nanog”, *Stem Cells*, Vol. 24, 2006, pp. 1467–1475.
119. Kuroda T., Tada M., Kubota H., Kimura H., Hatano S.Y., Suemori H., Nakatsuji N., Tada T., “Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression”, *Mol. Cell Biol.*, Vol. 25, 2005, pp. 2475–2485.
120. Rodda D.J., Chew J.L., Lim L.H., Loh Y.H., Wang B., Ng H.H., Robson P., “Transcriptional regulation of Nanog by Oct4 and Sox2”, *J. Biol. Chem.*, Vol. 280, 2005, pp. 24731–24737.
121. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., Johnstone S.E., Levine S.S., Zucker J.P., Guenther M.G., Kumar R.M., Murray H.L., Jenner R.G., Gifford D.K., Melton DA, Jaenisch R, Young RA. “Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells”, *Cell*, Vol. 122, 2005, pp. 947–956.
122. Loh Y.H., Wu Q., Chew J.L., Vega V.B., Zhang W., Chen X., Bourque G., George J., Leong B., Liu J., Wong K.Y., Sung K.W., Lee C.W., Zhao X.D., Chiu K.P., Lipovich L., Kuznetsov V.A., Robson P., Stanton L.W., Wei C.L., Ruan Y., Lim B., Ng H.H., “The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells”, *Nat. Genet.*, Vol. 38, 2006, pp. 431–440.

123. Adhikary S., Eilers M., “Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Vol. 6, 2005, pp. 635–645.
124. Knoepfler P.S., Zhang X.Y., Cheng P.F., Gafken P.R., McMahon S.B., Eisenman RN. “Myc influences global chromatin structure”, *EMBO J.*, Vol. 25, 2006, pp. 2723–2734.
125. O'Donnell K.A., Wentzel E.A., Zeller K.I., Dang C.V., Mendell J.T., “c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression”, *Nature*, Vol. 435, 2005, pp. 839–843.
126. Rowland B.D., Bernards R., Peeper D.S., “The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene”, *Nat. Cell Biol.*, Vol. 7, 2005, pp. 1074 –1082.
127. Nakatake Y., Fukui N., Iwamatsu Y., Masui S., Takahashi K., Yagi R., Yagi K., Miyazaki J., Matoba R., Ko M.S., Niwa H., “Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells”, *Mol. Cell Biol.*, Vol. 26, 2006, pp. 7772–7782.
128. Richards M., Tan S.P., Tan J.H., “The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE”, *Stem Cells.*, Vol. 22, no. 1, 2004, 51-64
129. Jaenisch R., Young R., “Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming”, *Cell*, Vol. 132, no. 4, 2008, pp. 567-582.

130. Takahashi K., Yamanaka S., “Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors”, *Cell*, Vol. 126, 2006, pp. 663–676.
131. Yamanaka S., “Strategies and new developments in the generation of patient-specific stem cells”, *Cell Stem Cell*, Vol. 1, 2007, pp. 39–49.
132. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S., “Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factor”, *Cell*, Vol. 131, 2007, pp. 861–872.
133. Park I.H., Zhao R., West J.A., Yabuuchi A., Huo H., Ince T.A., Lerou P.H., Lensch M.W., Daley G.Q., “Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors”, *Nature*, Vol. 451, 2008, pp. 141–146.
134. Aasen T., Raya A., Barrero M.J., Garreta E., Consiglio A., Gonzalez F., Vassena R., Bilić J., Pekarik V., Tiscornia G., Edel M., Boué S., Izpisua Belmonte J.C., “Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes”, *Nature Biotechnol.*, Vol. 26, 2008, pp. 1276–1284.
135. Yu J., Hu K., Smuga-Otto K., Tian S., Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. “Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences”, *Science*, Vol. 324, no. 5928, 2009, pp. 797-801.

136. Corti S., Nizzardo M., Simone C., Falcone M., Nardini M., Ronchi D., Donadoni C., Salani S., Riboldi G., Magri .F, Menozzi G., Bonaglia C., Rizzo F., Bresolin N., Comi G.P., “Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy”, *Sci Transl Med.*, Vol. 4, no. 165, 2012.
137. Nizzardo M., Simone C., Rizzo F., Ruggieri M., Salani S., Riboldi G., Faravelli I., Zanetta C., Bresolin N., Comi G.P., Corti S., “Minimally invasive transplantation of iPSC-derived ALDHhiSSCloVLA4+ neural stem cells effectively improves the phenotype of an amyotrophic lateral sclerosis model”. *Hum Mol Genet.*, Vol. 23, no. 2, 2014, pp. 342-54.
138. Rao M., Gottesfeld J.M., “Introduction to thematic minireview series: Development of human therapeutics based on induced pluripotent stem cell (iPSC) technology”, *J Biol Chem.*, Vol. 289, no. 8, 2014, pp. 4553-4554.
139. Gao J., Coggeshall R.E., Tarasenko Y.I., Wu P., “Human neural stem cell-derived cholinergic neurons innervate muscle in motoneuron deficient adult rats”. *Neuroscience.*, Vol 131, no. 2, 2005, pp. 257-262.
140. Payne N.L., Sylvain A., O'Brien C., Herszfeld D., Sun G., Bernard C.C., “Application of human induced pluripotent stem cells for modeling and treating neurodegenerative diseases”. *N Biotechnol.*, 2014.
141. Folmes C.D., Martinez-Fernandez A., Perales-Clemente E., Li X., McDonald A., Oglesbee D., Hrstka S.C., Perez-Terzic C., Terzic A., Nelson T.J., “Disease-causing mitochondrial heteroplasmy segregated

within induced pluripotent stem cell clones derived from a patient with MELAS", *Stem Cells*, Vol. 31, no. 7, 2013, pp. 1298-1308.

142. Herrmann D.N., "Experimental therapeutics in hereditary neuropathies: the past, the present, and the future", *Neurotherapeutics*, Vol. 5, no. 4, 2008, pp. 507-515.

143. Wood M., Yin H., McClorey G., "Modulating the expression of disease genes with RNA-based therapy". *PLoS Genet.*, Vol. 3, no. 6, 2007, pp. 109. Review.

144. Bhindi R., Fahmy R.G., Lowe H.C., Chesterman C.N., Dass C.R., Cairns M.J., Saravolac E.G., Sun L.Q., Khachigian L.M., "DNA enzymes, short interfering RNA, and the emerging wave of small-molecule nucleic acid-based gene-silencing strategies". *Am J Pathol.*, Vol. 171, no. 4, 2007, pp. 1079-1088.

145. Muntoni F., Wood M.J., "Targeting RNA to treat neuromuscular disease", *Nat Rev Drug Discov.*, Vol. 10., no. 8, 2011, pp. 621-637.

146. Muntoni F., Torelli S., Wells D.J., Brown S.C., "Muscular dystrophies due to glycosylation defects: diagnosis and therapeutic strategies". *Curr Opin Neurol.*, Vol. 24, no. 5, 2011, pp. 437-442. Review.

147. Seto J.T., Bengtsson N.E., Chamberlain J.S., "Therapy of Genetic Disorders-Novel Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy", *Curr Pediatr Rep.*, Vol. 2, n. 2, 2014, pp.102-112.

148. Wang Z., Rao D.D., Senzer N., Nemunaitis J., "RNA interference and cancer therapy" *Pharm Res.*, Vol. 28, no. 12, 2011, 2011, pp. 2983-2995.
149. Hamilton A.J., Baulcombe D.C., "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants", *Science*, Vol. 286, no. 5441, 1999, pp. 950-952.
150. Elbashir S.M., Martinez J., Patkaniowska A., Lendeckel W., Tuschl T., "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate", *EMBO J*, Vol. 20, no. 23, 2001, pp. 6877-6888.
151. McCaffrey A.P., Meuse L., Pham T.T., Conklin D.S., Hannon G.J., Kay M.A., "RNA interference in adult mice", *Nature*, Vol. 418, no. 6893, 2002, pp. 38-39.
152. Kanasty R., Dorkin J.R., Vegas A., Anderson D., "Delivery materials for siRNA therapeutics", *Nat Mater.*, Vol. 12, no. 11, 2013, pp. 967-977.
153. Lee N.S., Dohjima T., Bauer G., Li H., Li M.J., Ehsani A., Salvaterra P., Rossi J., "Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells", *Nat Biotechnol.*, Vol. 20, no. 5, 2002, pp. 500-505
154. Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Lührmann R., Tuschl T., "Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi", *Cell*, Vol. 110, no. 5, 2002, pp. 563-74.

155. Barton K.M., Burch B.D., Soriano-Sarabia N., Margolis D.M., "Prospects for treatment of latent HIV", *Clin Pharmacol Ther.*, Vol. 93, no.1, 2013, pp. 46-56.

156. Frank-Kamenetsky M., Grefhorst A., Anderson N.N., Racie T.S., Bramlage B., Akinc A., Butler D., Charisse K., Dorkin R., Fan Y., Gamba-Vitalo C., Hadwiger P., Jayaraman M., John M., Jayaprakash K.N., Maier M., Nechev L., Rajeev K.G., Read T., Röhl I., Soutschek J., Tan P., Wong J., Wang G., Zimmermann T., de Fougerolles A., Vornlocher H.P., Langer R., Anderson D.G., Manoharan M., Koteliensky V., Horton J.D., Fitzgerald K., "Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. 105, no. 33, 2008, pp. 11915-11920.

157. Czech M.P., Aouadi M., Tesz G.J., "RNAi-based therapeutic strategies for metabolic disease", *Nat Rev Endocrinol.*, Vol. 7, no. 8, 2011, pp. 473-484.

158. Fukuhara T., Kambara H., Shiokawa M., Ono C., Katoh H., Morita E., Okuzaki D., Maehara Y., Koike K., Matsuura Y., "Expression of microRNA miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with hepatitis C virus", *J Virol.*, Vol. 86, no. 15, 2012, pp. 7918-7933.

159. Golovanova E.V., "Treatment of chronic viral hepatitis: achievements and prospects", *Eksp Klin Gastroenterol.*, Vol. 6, 2012, pp. 3-12. Review.

160. Xue B., Beltz T.G., Johnson R.F., Guo F., Hay M., Johnson A.K., "PVN adenovirus-siRNA injections silencing either NOX2 or NOX4 attenuate aldosterone/NaCl-induced hypertension in mice". *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, Vol. 302, no. 3, 2012, pp. 733-741.
161. Lu P., Yuan L., Wang Y., Du Q., Sheng J., "Effect of GPE-AGT nanoparticle shRNA transfection system mediated RNAi on early atherosclerotic lesion", *Int J Clin Exp Pathol.*, Vol. 5, no.7, 2012, pp. 698-706.
162. Peixoto A.J., Orias M., Desir G.V., "Does kidney disease cause hypertension?", *Curr.Hypertens.*, Vol. 5, 2013, pp. 89–94.
163. Bora R.S., Gupta D., Mukkur T.K., Saini K.S., "RNA interference therapeutics for cancer: challenges and opportunities", *Mol Med Rep.*, Vol. 6, no.1, 2012, pp. 9-15.
164. Huang P.I., Lo W.L., Cherng J.Y., Chien Y., Chiou G.Y., Chiou S.H., "Non-viral delivery of RNA interference targeting cancer cells in cancer gene therapy", *Curr Gene Ther.*, Vol. 12, no. 4, 2012, pp. 275-284. Review.
165. Miele E., Spinelli G.P., Miele E., Di Fabrizio E., Ferretti E., Tomao S., Gulino A., "Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy", *Int J Nanomedicine*, Vol. 7, 2012, pp. 3637-3657.
166. Goodchild J., "Therapeutic oligonucleotides", *Methods Mol Biol.*, Vol. 764, 2011, pp. 1-15. Review.

167. Salta E., De Strooper B., “Non-coding RNAs with essential roles in neurodegenerative disorders”, *Lancet Neurol.*, Vol. 11, no. 2, 2012, pp. 189-200.
168. Miller K.E., Sheetz M.P., “Axonal mitochondrial transport and potential are correlated”, *J Cell Sci.*, Vol. 117, no. 13, 2004, pp. 2791-2804.
169. Rodriguez-Lebron E., Paulson H.L., “Allele-specific RNA interference for neurological disease”, *Gene Ther.*, Vol. 13, no. 6, 2006, pp. 576-581. Review.
170. Van Bilsen P.H., Jaspers L., Lombardi M.S., Odekerken J.C., Burright E.N., Kaemmerer W.F., “Identification and allele-specific silencing of the mutant huntingtin allele in Huntington's disease patient-derived fibroblasts”, *Hum Gene Ther.*, Vol. 19, no. 7, 2008, pp. 710-719.
171. Hohjoh H., “Disease-causing allele-specific silencing by RNA interference”, *Pharmaceuticals (Basel)*, Vol. 6, no. 4, 2013, pp. 522-535.
172. Rodriguez-Lebron E., Paulson H.L., “Allele-specific RNA interference for neurological disease”, *Gene Ther.*, Vol. 13, no. 6, 2006, pp. 576-581. Review.
173. Gonzalez-Alegre P., Miller V.M., Davidson B.L., Paulson H.L., “Toward therapy for DYT1 dystonia: allele-specific silencing of mutant TorsinA”, *Ann Neurol*, Vol. 53, 2003, pp. 781–787

174. Spänkuch B., Strebhardt K., “RNA interference-based gene silencing in mice: the development of a novel therapeutical strategy”, *Curr Pharm Des.*, Vol. 11, no. 26, 2005, pp. 3405-3419. Review.
175. Paddison P.J., Caudy A.A., Bernstein E., Hannon G.J., Conklin D.S., “Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells”, *Genes Dev.*, Vol. 16, 2002, pp. 948–958.
176. Kubodera T., Yokota T., Ishikawa K., Mizusawa H., “New RNAi strategy for selective suppression of a mutant allele in polyglutamine disease”, *Oligonucleotides*, Vol. 15, no.4, 2005, pp. 298-302.
177. Kubodera T., Yamada H., Anzai M., Ohira S., Yokota S., Hirai Y., Mochizuki H., Shimada T., Mitani T., Mizusawa H., Yokota T., “In vivo application of an RNAi strategy for the selective suppression of a mutant allele”. *Hum Gene Ther.*, Vol. 22, no.1, 2011, pp. 27-34.
178. Deng Y., Wang C.C., Choy K.W., Du Q., Chen J., Wang Q., Li L., Chung T.K., Tang T., “Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies”, *Gene*, Vol. 538, no. 2, 2014, pp. 217-227.
179. Murlidharan G., Samulski R.J., Asokan A., “Biology of adeno-associated viral vectors in the central nervous system”, *Front Mol Neurosci.*, Vol. 7, 2014, pp. 76. Review.
180. Lo W.D., Qu G., Sferra T.J., Clark R., Chen R., Johnson P.R., “Adeno-associated virus-mediated gene transfer to the brain: duration

and modulation of expression", *Hum Gene Ther.*, Vol. 10, no. 2, 1999, pp. 201-213.

181. McCown T.J., "Adeno-associated virus (AAV) vectors in the CNS", *Curr Gene Ther.*, Vol. 5, no. 3, 2005, pp. 333-338. Review.

182. Xiao X., Li J., Samulski R.J., "Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus". *J Virol.*, Vol. 72, no. 3, 1998, pp. 2224-2232.

183. Cearley C.N., Wolfe J.H., "A single injection of an adeno-associated virus vector into nuclei with divergent connections results in widespread vector distribution in the brain and global correction of a neurogenetic disease", *J Neurosci.*, Vol. 27, no. 37, 2007, pp. 9928-9940.

184. Guo P., El-Gohary Y., Prasad K., Shiota C., Xiao X., Wiersch J., Paredes J., Tulachan S., Gittes G.K.. "Rapid and simplified purification of recombinant adeno-associated virus", *J Virol Methods.*, Vol. 183, no. 2, 2012, pp. 139-146.

185. McCown T.J., Xiao X., Li J., Breese G.R., Samulski R.J., "Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus (AAV) vector". *Brain Res.*, Vol. 713, no. 1, 1996, pp. 99-107.

186. Berns K.I., Linden R.M., "The cryptic life style of adeno-associated virus. Bioessays", Vol. 17, no. 3, 1995, pp. 237-45. Review.

187. Samulski R.J., Chang L.S., Shenk T., "Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression", *J Virol.*, Vol. 63, no.9, 1989, pp.3822-3828.
188. Zaiss A.K., Muruve D.A., "Immune responses to adeno-associated virus vectors", *Curr Gene Ther.*, Vol. 5, no.3, 2005, pp. 323-331. Review.
189. McCarty D.M., Young S.M., Samulski R.J., "Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors", *Annu Rev Genet.*, Vol. 38, 2004, pp. 819-845. Review.
190. Gao G., Vandenberghe L.H., Alvira M.R., Lu Y., Calcedo R., Zhou X., Wilson J.M., "Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues", *J Virol.*, Vol. 78, no. 12, 2004, pp. 6381-6388.
191. Bartlett J.S., Samulski R.J., McCown T.J., "Selective and rapid uptake of adeno-associated virus type 2 in brain", *Hum Gene Ther.*, Vol. 9, no. 8, 1998, pp. 1181-1186.
192. Nguyen J.B., Sanchez-Pernaute R., Cunningham J., Bankiewicz K.S., "Convection-enhanced delivery of AAV-2 combined with heparin increases TK gene transfer in the rat brain", *Neuroreport.*, Vol. 12, no. 9, 2001, pp. 1961-1964.
193. Chao H., Liu Y., Rabinowitz J., Li C., Samulski R.J., Walsh C.E., "Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct

adeno-associated viral serotype vectors", *Mol Ther.*, Vol. 2, no. 6, 2000, pp. 619-623.

194. Burger C., Gorbatyuk O.S., Velardo M.J., Peden C.S., Williams P., Zolotukhin S., Reier P.J., Mandel R.J., Muzyczka N., "Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system", *Mol Ther.*, Vol. 10, no. 2, 2004, pp. 302-317.

195. Carter B.J., "Adeno-associated virus vectors in clinical trials", *Hum Gene Ther.*, Vol. 16, no. 5, 2005, pp. 541-550. Review.

196. McCarty D.M., Monahan P.E., Samulski R.J., "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", *Gene Ther.*, Vol. 8, no. 16, 2001, pp. 1248-1254.

197. Wang Z., Ma H. I., Li J., Sun L., Zhang J., Xiao X., "Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo", *Gene Ther.*, Vol.10, 2003, pp.2105–2111.

198. McCarty D.M., Fu H., Monahan P.E., Toulson C.E., Naik P., Samulski, R.J., "Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo", *Gene Ther.*, Vol. 10, 2003, pp. 2112–2118.

199. Fu H., "Self-complementary adeno-associated virus serotype 2 vector: global distribution and broad dispersion of AAV-mediated transgene expression in mouse brain". *Mol. Ther.*, Vol. 8, 2003, pp. 911–917.
200. Yang G.S., Schmidt M., Yan Z., Lindbloom J.D., Harding T.C., Donahue B.A., Engelhardt J.F., Kotin R., Davidson B.L., "Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size", *J Virol.*, Vol. 76, no. 15, 2002, pp. 7651-7660.
201. Muzyczka N., Warrington K.H., "Custom adeno-associated virus capsids: the next generation of recombinant vectors with novel tropism". *Hum Gene Ther.*, Vol. 16, no. 4, 2005, 408-416. Review.
202. Choi V.W., McCarty D.M., Samulski R.J., "AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery", *Curr Gene Ther.*, Vol. 5, no. 3, 2005, pp. 299-310. Review.
203. Foust K.D., Nurre E., Montgomery C.L., Hernandez A., Chan C.M., Kaspar B.K., "Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes", *Nat Biotechnol.*, Vol. 27, no.1, 2009, pp. 59-65.
204. Bevan A.K., Duque S., Foust K.D., Morales P.R., Braun L., Schmelzer L., Chan C.M., McCrate M., Chicoine L.G., Coley B.D., Porensky P.N., Kolb S.J., Mendell J.R., Burghes A.H., Kaspar B.K., "Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain,

and peripheral tissues for pediatric disorders”, *Mol Ther.*, Vol. 19, no. 11, 2011, pp. 1971-1980.

205. Foust K.D., Wang X., McGovern V.L., Braun L., Bevan A.K., Haidet A.M., Le T.T., Morales P.R., Rich M.M., Burghes A.H., Kaspar B.K., “Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN”, *Nat Biotechnol.*, Vol. 28, no. 3, 2010, pp. 271-274.

206. Passini M.A., Bu J., Roskelley E.M., Richards A.M., Sardi S.P., O’Riordan C.R., Klinger K.W., Shihabuddin L.S., Cheng S.H., “CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular atrophy”, *J Clin Invest.*, Vol. 120, no. 4, pp. 1253-1264.

207. Valori C.F., Ning K., Wyles M., Mead R.J., Grierson A.J., Shaw P.J., Azzouz M., “Systemic delivery of scAAV9 expressing SMN prolongs survival in a model of spinal muscular atrophy”, *Sci Transl Med.*, Vol. 2, no. 35, 2010, pp. 35.

208. Dominguez E., Marais T., Chatauret N., Benkhelifa-Ziyyat S., Duque S., Ravassard P., Carcenac R., Astord S., Pereira de Moura A., Voit T., Barkats M., “Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice”. *Hum Mol Genet.*, Vol. 20, no. 4, 2011, pp. 681-693.

209. Foust K.D., Salazar D.L., Likhite S., Ferraiuolo L., Ditsworth D., Ilieva H., Meyer K., Schmelzer L., Braun L., Cleveland D.W., Kaspar B.K., “Therapeutic AAV9-mediated suppression of mutant SOD1 slows

disease progression and extends survival in models of inherited ALS”, *Mol Ther.*, Vol. 21, no.12, 2013, pp. 2148-2159.

210. Fusaki N., Ban H., Nishiyama A., Saeki K., Hasegawa M., “Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome”, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.*, Vol. 85, no. 8, 2009, pp.348-362.

211. Cartoni R., Martinou J.C., “Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A”, *Exp Neurol.*, Vol. 218, no. 2, 2009, pp. 268-273.

212. Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R., “A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells”, *Science*, Vol. 296, no. 5567, 2002, pp. 550-553.

213. Kunkel T.A., “Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 82, no.2, 1985, pp. 488-492.

214. Sugimoto M., Esaki N., Tanaka H., Soda K., “A simple and efficient method for the oligonucleotide-directed mutagenesis using plasmid DNA template and phosphorothioate-modified nucleotide”, *Anal Biochem.*, Vol. 179, no. 2, 1989, pp. 309-311.

215. Hübner P., Iida S., Arber W., “Random mutagenesis using degenerate Oligodeoxyribonucleotides”, *Gene*, Vol. 73, no. 2, 1988, pp. 319-325.

216. Vandeyar M.A., Weiner M.P., Hutton C.J., Batt C.A., "A simple and rapid method for the selection of oligodeoxynucleotide-directed mutants", *Gene*, Vol. 65, no.1, 1988, pp. 129-133.

217. Nizzardo M., Simone C., Salani S., Ruepp M.D., Rizzo F., Ruggieri M., Brajkovic S., Moulton H.M., Muehlemann O., Bresolin N., Comi G.P., Corti S., "Combined systemic and local morpholino treatment rescues the phenotype of SMA $\Delta 7$ mouse model", *Clin Ther.*, Vol. 36, no. 3, 2014, pp. 340-356.

218. Vallat J.M., Ouvrier R.A., Pollard J.D., Magdelaine C., Zhu D., Nicholson G.A., "Histopathological findings in hereditary motor and sensory neuropathy of axonal type with onset in early childhood associated with mitofusin 2 mutations", *J Neuropathol Exp Neurol.*, Vol. 67, 2008, pp. 1097-1102.

219. Funalot B., Magdelaine C., Sturz F., Ouvrier R., Vallat J.M., "Ultrastructural lesions of axonal mitochondria in patients with childhood-onset Charcot-Marie-Tooth disease due to MFN2 mutations", *bull Acad natl Med*, Vol. 193, 2009, pp. 151-160.

220. Huang P., Yu T., Yoon Y., "Mitochondrial clustering induced by overexpression of the mitochondrial fusion protein Mfn2 causes mitochondrial dysfunction and cell death", *Eur J Cell Biol.*, Vol. 86, 2007, pp. 289–302.

221. Rojo M., Legros F., Chateau D., Lombes A., "Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian

homologs of the transmembrane GTPase Fzo", *J Cell Sci*, Vol. 115, 2002, pp. 1663–1674.

222. Stojanovski D., Koutsopoulos O.S., Okamoto K., Ryan M.T., "Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology", *J Cell Sci*, Vol. 117, 2004, pp. 1201–1210.

223. Chan D.C., "Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development", *Cell Vol.*, 125, 2006, pp. 1241–1252.

224. Amati-Bonneau P., Valentino M.L., Reynier P., Gallardo M.E., Bornstein B., Boissie`re A., Campos Y., Rivera H., de la Aleja J.G., Carroccia R., Iommarini L., Labauge P., Figarella-Branger D., Marcorelles P., Furby A., Beauvais K., Letournel F., Liguori R., La Morgia C., Montagna P., Liguori M., Zanna C., Rugolo M., Cossarizza A., Wissinger B., Verny C., Schwarzenbacher R., Marti´n M.A., Arenas J., Ayuso C., Garesse R., Lenaers G., Bonneau D., Carelli V., "OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes", *Brain*, Vol. 131, 2008, pp. 338–351.

225. Hudson G., Amati-Bonneau P., Blakely E.L., Stewart J.D., He L., Schaefer A.M., Griffiths P.G., Ahlqvist K., Suomalainen A., Reynier P., McFarland R., Turnbull D.M., Chinnery P.F., Taylor R.W., "Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance", *Brain*, Vol. 131, 2008, pp. 329–337.

226. Ohnishi Y., Tamura Y., Yoshida M., Tokunaga K., Hohjoh H., "Enhancement of allele discrimination by introduction of nucleotide

mismatches into siRNA in allele-specific gene silencing by RNAi", *PLoS One*, Vol.3, 2008, pp. 2248.

PRODOTTI SCIENTIFICI

-Nizzardo M, Simone C, **Rizzo F**, Ruggieri M, Riboldi G, Salani S, Bucchia M, Bresolin N, Comi GP, Corti S. iPSC-derived neural stem cells act via kinase inhibition to exert neuroprotective effects in Spinal Muscular Atrophy with Respiratory Distress Type 1. Stem Cell Report.

-Nizzardo M, Simone C, Salani S, Ruepp MD, **Rizzo F**, Ruggieri M, Brajkovic S, Moulton HM, Muehlemann O, Bresolin N, Comi GP, Corti S. Combined systemic and local morpholino treatment rescues the phenotype of SMA $\Delta 7$ mouse model. Clin Ther. 2014 Mar 1;36(3):340-356.

-**Rizzo F**, Riboldi G, Salani S, Nizzardo M, Simone C, Corti S, Hedlund E. Cellular therapy to target neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis. Cell Mol Life Sci. 2013.

-Ranieri M, Brajkovic S, Riboldi G, Ronchi D, **Rizzo F**, Bresolin N, Corti S, Comi GP. Mitochondrial fusion proteins and human diseases. Neurol Res Int. 2013; 2013: 293893.

-Salani S, Donadoni C, **Rizzo F**, Bresolin N, Comi GP, Corti S. Generation of skeletal muscle cells from embryonic and induced pluripotent stem cells as an in vitro model and for therapy of muscular dystrophies. J Cell Mol Med. 2012 Jul;16(7):1353-64.

-Nizzardo M, Simone C, **Rizzo F**, Ruggieri M, Salani S, Riboldi G, Faravelli I, Zanetta C, Bresolin N, Comi GP, Corti S. Minimally invasive transplantation of iPSC-derived ALDHhiSSCloVLA4+ neural stem cells

effectively improves the phenotype of an amyotrophic lateral sclerosis model. Hum Mol Genet. 2014 Jan 15;23(2):342-54.

-Corti S, Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Nardini M, Ronchi D, Donadoni C, Salani S, Riboldi G, Magri F, Menozzi G, Bonaglia C, **Rizzo F**, Bresolin N, Comi GP. Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy. Sci Transl Med. 2012 Dec 19;4(165):165ra162.

-Corti S, Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Donadoni C, Salani S, **Rizzo F**, Nardini M, Riboldi G, Magri F, Zanetta C, Faravelli I, Bresolin N, Comi GP. Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons. Exp Cell Res. 2012 Aug 1;318(13):1528-41.

-Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Riboldi G, **Rizzo F**, Magri F, Bresolin N, Comi GP, Corti S. Research advances in gene therapy approaches for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. Cell Mol Life Sci. 2012 May;69(10):1641-50.

RINGRAZIAMENTI

A lavor concluso, qualche ringraziamento è doveroso.

Sono tante le persone che meritano il mio grazie perché, con grande affetto e professionalità, mi hanno accompagnata, sostenuta ed aiutata in ogni fase di questo lavoro di ricerca.

Grazie di cuore all'“Associazione progetto mitofusina2”, cui questo lavoro deve tantissimo non solo per il loro supporto economico, di certo indispensabile, ma anche per la fiducia e l'affetto che hanno riposto in me fin da subito.

Un grazie sentito al Prof. Comi e alla Dott. Corti che mi hanno proposto di partecipare ad un progetto a cui non è stato difficile appassionarsi e che hanno seguito con interesse ed attenzione ogni fase di questo studio.

Grazie al gruppo del Prof Moggio per l'aiuto in particolare nelle analisi istologiche.

Da ultimo, grazie a tutti i miei colleghi che mi hanno supportato e consigliato, contribuendo con la loro disponibilità e il loro entusiasmo ad arricchire questo lavoro.